



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 894**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)  
**C12Q 1/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03790894 .4**  
96 Fecha de presentación : **10.08.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1536827**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Uso de la proteína quinasa N beta.**

30 Prioridad: **14.08.2002 EP 02018572**  
**11.09.2002 US 409570 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.05.2009**

73 Titular/es: **Silence Therapeutics Aktiengesellschaft**  
**Robert-Rössle-Strasse 10**  
**13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Klippel-Giese, Anke y**  
**Kaufmann, Jörg**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 319 894 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de la proteína quinasa N beta.

5 La presente invención está relacionada con el uso de la proteína quinasa N beta. El uso de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, un método para el cribado de un agente que usa proteína quinasa N beta y el uso de anticuerpos, aptómeros, spiegelmeros, oligonucleótidos antisentido, ribozimas y siARN dirigido en contra de ésta.

10 El desarrollo de fármacos modernos no depende ya de un enfoque más o menos heurístico, sino que implica típicamente la elucidación del mecanismo molecular que subyace en una enfermedad o un proceso, la identificación de las moléculas diana candidatas y la evaluación de dichas moléculas diana. Una vez que dicha molécula diana validada, a la que se denomina también en este documento como diana, está disponible, pueden ensayarse candidatos a fármaco dirigidos a ella. En muchos casos, dichos candidatos a fármaco son miembros de una biblioteca de compuestos que puede consistir en compuestos sintéticos o naturales. También es común el uso de bibliotecas de combinación. A dichas bibliotecas de compuestos también se las denomina en este documento como bibliotecas de compuestos candidatos. Aunque en el pasado se ha probado que este enfoque tiene éxito, es todavía consumidor de tiempo y dinero. Diferentes tecnologías se aplican actualmente para la identificación de dianas y la validación de dianas.

20 Aún, numerosos tumores y cánceres son una gran amenaza para la salud humana. Para crear fármacos más seguros y más poderosos que tengan menos efectos secundarios, es necesario saber sobre las moléculas diana que, estando dirigidas por compuestos apropiados, pueden estar específica y selectivamente influidas en su actividad o presencia. Por la preferible interacción selectiva y específica entre el compuesto, que puede ser un fármaco potencial o candidato, y la diana, la función de la diana en una enfermedad o proceso enfermo tal como, por ejemplo, cáncer, tumorigénesis y metástasis, puede estar influida y así la enfermedad tratada o evitada y el proceso enfermo mejorado.

25 El problema subyacente en la presente invención era, por lo tanto, proporcionar una diana que sea adecuada para las propuestas terapéuticas en el tratamiento de tumorigénesis y cáncer. Era un problema adicional subyacente en la presente invención el proporcionar una diana que esté implicada en la tumorigénesis y la metástasis.

30 El problema subyacente en la presente invención se resuelve por el contenido de las reivindicaciones independientes anexas. Las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes.

35 El problema subyacente en la presente invención se resuelve más específicamente en un primer aspecto por el uso *in vitro* de la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, por el cual dicho fragmento desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta como una diana posterior de la ruta de la PI 3-quinasa, preferiblemente como una diana de fármaco posterior de la ruta de la PI 3-quinasa.

40 El problema subyacente en la presente invención se resuelve en un segundo aspecto por el uso *in vitro* de la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, por el cual dicho fragmento desarrolla los efectos de una proteína quinasa N beta, una diana posterior de la ruta de la PI 3-quinasa en un proceso de cribado.

45 El problema subyacente en la presente invención se resuelve en un tercer aspecto mediante el uso de la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, por el cual dicho fragmento desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres, cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implique la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquileomas, macrocefalia, retraso mental, hamatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas.

55 En una realización del uso según el primero del tercer aspecto de la presente invención, la proteína quinasa N beta tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO. 1 o según la entrada de la base de datos PID g7019489 o entrada de la base de datos gi 7019489, o una parte o derivada de la misma.

60 El problema subyacente en la presente invención se resuelve en un cuarto aspecto mediante el uso de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, o un fragmento del mismo, por el cual dicho fragmento desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres, cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implique la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquileomas, macrocefalia, retraso mental, hamatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos,

## ES 2 319 894 T3

enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas.

5 En una realización del uso según el cuarto aspecto de la presente invención, la proteína quinasa N beta tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO. 1 o según la entrada de la base de datos PID g7019489 o la entrada de la base de datos gi 7019489, o una parte o derivado de la misma.

10 En otra realización del uso según el cuarto aspecto de la presente invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico según la SEQ ID NO. 2 o según las entradas de la base de datos gi 7019488 o NM\_01335, preferiblemente NM\_01335.1.

15 En otra realización del uso según cualquiera de los aspectos de la presente invención, la proteína quinasa N beta está codificada por un ácido nucleico según la SEQ ID NO. 2 o según las entradas de la base de datos gi 7019488 o NM\_01335, preferiblemente NM\_01335.1.

En otra realización preferida del uso según el cuarto aspecto de la presente invención, la secuencia del ácido nucleico, salvo por la degeneración del código genético podría hibridar al sujeto de ácido nucleico al cuarto aspecto de la presente invención.

20 En una realización adicional del uso según cualquiera de los aspectos de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico es una secuencia nucleica que hibrida bajo condiciones astringentes a la secuencia de ácido nucleico o parte de la misma, según la SEQ ID NO. 2 o según las entradas de la base de datos gi 7019488 o NM\_01335, preferiblemente la NM\_01335.1.

25 En una realización preferida del uso según cualquier aspecto de la presente invención, la enfermedad se caracteriza de manera que las células que están implicadas en dicha enfermedad, carecen de actividad PTEN, muestran un comportamiento más agresivo o son células de un tumor en fase tardía.

30 En una realización más preferida del uso según el cuarto aspecto de la presente invención, la enfermedad es un tumor en fase tardía.

35 El problema subyacente en la presente invención se resuelve en un quinto aspecto mediante un método para el cribado de un agente para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y/o para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres, cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa que comprende las etapas:

- a) proporcionar un compuesto candidato,
- 40 b) proporcionar un sistema de expresión para la proteína quinasa N beta y/o un sistema de detección de la actividad de la proteína quinasa N beta;
- c) poner en contacto el compuesto candidato con el sistema de expresión para la proteína quinasa N beta y/o el sistema de detección de actividad de la proteína quinasa N beta;
- 45 d) determinar si la expresión y/o la actividad de la proteína quinasa N beta se cambia bajo la influencia del compuesto candidato.

50 En una realización del método según el cuarto aspecto de la presente invención, el compuesto candidato está contenido en una biblioteca de compuestos.

55 En otra realización del método según el cuarto aspecto de la presente invención, el compuesto candidato se selecciona del grupo de clases de compuestos que comprenden péptidos, proteínas, anticuerpos, anticalinas, ácidos nucleicos funcionales, compuestos naturales y moléculas pequeñas.

En una realización preferida del método según el cuarto aspecto de la presente invención, los ácidos nucleicos funcionales se seleccionan del grupo que comprenden aptómeros, aptazimas, ribozimas, spiegelmeros, oligonucleótidos antisentido y siARN.

60 En una realización preferida adicional del método según el quinto aspecto de la presente invención, la proteína quinasa N beta o el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta son los descritos en conexión con cualquier otro aspecto de la presente invención.

65 El problema subyacente en la presente invención se resuelve en un sexto aspecto y un séptimo aspecto mediante el uso de un anticuerpo contra la proteína quinasa N beta o una parte de la misma que interactúa con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y/o para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres, cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la

ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas.

El problema subyacente en la presente invención se resuelve en un octavo, noveno y décimo aspecto mediante el uso de un ácido nucleico que interactúa con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para el desarrollo o fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, y para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres, cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas y por lo cual el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende aptómeros y spiegelmeros.

El problema subyacente en la presente invención se resuelve en un aspecto undécimo, duodécimo y decimotercero mediante el uso de un ácido nucleico que interactúa con un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o parte de la misma, para el desarrollo o fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y/o para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres, cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas, por lo cual el ácido nucleico que interactúa es un oligonucleótido antisentido, un ribozima y/o siARN.

En una realización adicional del uso según el aspecto undécimo, duodécimo y decimotercero de la presente invención, el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte o derivado de la misma, es el cADN, mARN o hnARN.

En una realización del uso según el aspecto undécimo, duodécimo y decimotercero de la presente invención, la proteína quinasa N beta y/o el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta es la descrita en conexión con cualquier aspecto de la presente invención.

El problema subyacente de la presente invención se resuelve en un decimocuarto aspecto por un equipo para la caracterización de una enfermedad o un proceso que se selecciona del grupo que comprende cánceres, cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI-3 quinasa, que comprende al menos un agente que se selecciona del grupo que comprende la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, anticuerpos específicos para la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, polipéptidos que interactúan con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, polipéptidos que interactúan con un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o parte de la misma, ácidos nucleicos que interactúan con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, ácidos nucleicos que interactúan con un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, y opcionalmente al menos otro compuesto.

Los actuales inventores han encontrado sorprendentemente que la proteína quinasa N beta, a la que también se denomina en este documento como PKN beta, es una diana valiosa en conexión con el cáncer y los tumores. Más particularmente, los actuales inventores han descubierto que la proteína quinasa N beta es una diana posterior de la ruta de la PI-3 quinasa/PTEN. Incluso más sorprendentemente, los actuales inventores han descubierto que la proteína quinasa N beta está unida a la tumorigénesis y la metástasis. Particularmente, el último efecto parece estar fuertemente relacionado con la pérdida de la función supresora, más particularmente la función supresora tumoral de PTEN. Como se mostrará en los ejemplos, la proteína quinasa N beta estará sobre-regulada bajo condiciones donde el PTEN, que es un inhibidor de la ruta de la PI-3 quinasa, no está activo. Debido a la sobre-regulación de la proteína quinasa N beta, las células donde se da dicha sobre-regulación, mostrarán un aumento en el comportamiento metastático y el

comportamiento migracional. Esto significa que un inhibidor de la proteína quinasa N beta es un medio adecuado para controlar el comportamiento metastático y migracional de las células y que es un medio adecuado para el tratamiento de tumores y cánceres, más particularmente de aquellos tumores y cánceres que son metastáticos y cuyas células muestran un comportamiento metastático y/o migracional al que se denomina generalmente en este documento como “la enfermedad como se describe en este documento” o como “el proceso enfermo como se describe en este documento”. La enfermedad como se describe en este documento además del proceso enfermo como se describe en este documento comprende también tumorigénesis y metástasis. Esto se aplica particularmente a aquellas enfermedades como se describe en este documento o aquellos procesos enfermos como se describe en este documento, donde las células implicadas en dichas enfermedades o procesos enfermos son negativas en PTEN, lo que significa que el supresor tumoral PTEN no está activo o tiene un nivel reducido de actividad. Las enfermedades también comprenden aquellas enfermedades en que la ruta de PI 3-quinasa está implicada en general. Además de los tumores metastáticos en particular, la diabetes pertenece a esta clase de enfermedades y procesos enfermos, respectivamente. Por lo tanto, las células, particularmente aquellas que están implicadas en la enfermedad o proceso enfermo como se describe en este documento y que son negativas en PTEN, son susceptibles al tratamiento mediante un fármaco cuyo modo de acción es tal que reduce o elimina la actividad de la proteína quinasa N beta en las respectivas células implicadas. Por consiguiente, los pacientes cuyos tumores están caracterizados por una ruta de PI 3-quinasa preferiblemente hiperactivada, que incluye aunque no se limita a, o bien a través de la amplificación o mutación de genes que codifican componentes de la ruta de la PI 3-quinasa (p110, Akt) o son negativos en PTEN o quién tiene células que son negativas en PTEN, particularmente si estas células están implicadas en la enfermedad como se describe en este documento o en el proceso enfermo como se describe en este documento, pueden tratarse de forma ventajosa usando dichos fármacos. Dicha reducción en la actividad puede o bien provenir de una reducción al nivel de la transcripción o al nivel de la translación, es decir, la actividad enzimática de la proteína quinasa N beta. Sin desear estar atado por ninguna teoría, el último aspecto, es decir, la modificación de la actividad de la proteína quinasa N beta, es también un resultado de un entendimiento de los inventores en relación a las características de la PKNbeta, a saber, que la actividad enzimática de la PKNbeta puede además estar regulada en exceso o en defecto, más preferiblemente estar regulada en defecto.

Un grupo adicional de pacientes que puede ser tratado de forma ventajosa usando dichos fármacos son aquellos que sufren de cánceres que tienen una alta incidencia por pérdida de la función PTEN, especialmente en tumores en fase tardía (Cantley, L.C. y Neel. B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4240-4245; Ali, I.U. (2000). Gatekeeper for endometrium: the PTEN tumor suppressor gene. J Natl Cancer Inst 92, 861-863). La pérdida de PTEN se correlaciona con el comportamiento agresivo e invasivo aumentado de las respectivas células tumorales. Por esto, en realizaciones preferidas de la presente invención los agentes diagnósticos que además pueden usarse como herramientas o medios analíticos en conexión con los diversos aspectos de la presente invención, y los agentes terapéuticos, respectivamente, dirigidos a la proteína quinasa N beta o ácidos nucleicos que la codifican, pueden usarse por lo tanto para cualquier tumor con tal que se encuentre el pre-requisito mencionado anteriormente, a saber, que PTEN se correlacione con comportamiento agresivo e invasivo aumentado.

Esta clase de fármaco puede diseñarse, cribarse o fabricarse en base a la descripción dada en este documento, a saber, que la proteína quinasa N beta es una diana del fármaco posterior y que la proteína quinasa N beta es una diana para la tumorigénesis y metástasis y enfermedades relacionadas con ellas o que surgen de las mismas.

Por la implicación de la proteína quinasa N beta en los mecanismos como se esboza anteriormente, también puede usarse como un marcador para diagnosticar el estado de una célula o paciente que tiene en su cuerpo dicha clase de células, si sufrirá metástasis y tumorigénesis, respectivamente. Como un ejemplo de que esta clase de propuesta funciona y es aplicable para este propósito, es, por ejemplo, ICAM-1. ICAM-1 se usa en el pronóstico de cánceres gástricos que sufren metástasis (Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, Orita K. Int J Cancer. 1 de Agosto de 2002; 100(4):486-490) donde se encontró que los niveles de s-ICAM-1 eran elevados en pacientes con metástasis en el hígado. En otro ejemplo se usa osteopontina como un marcador de pronóstico para el cáncer de mama (Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, De Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley JH, Howitt R, West CR. Cancer Res. 15 de Junio de 2002; 62(12):3417-3427). En la medida en que la presencia o el nivel de presencia (proteína o mRNA) o el nivel de actividad de la proteína quinasa N beta pueda usarse como un marcador y cualquier compuesto que interactúa más o menos específicamente con la proteína quinasa N beta, será por lo tanto un agente de diagnóstico apropiado.

Métodos y principios de diseño para fármacos y agentes diagnósticos que en cualquier caso interactúan específica y/o selectivamente con la proteína quinasa N beta, se describirán en lo siguiente.

A la luz de estos descubrimientos, la quinasa N beta prueba que es una diana de fármaco posterior adecuada que permite la modulación selectiva de solo algunos aspectos que se relacionan típicamente con la ruta de la PI-3 quinasa, a saber, metástasis y migración, y una propuesta diagnóstica selectiva y específica, es decir, detección, de procesos típicamente relacionados con la ruta de la PI 3-quinasa, más particularmente metástasis y migración.

La ruta de la PI 3-quinasa se caracteriza por una actividad de PI 3-quinasa sobre la inducción del factor de crecimiento y una ruta de señalización paralela. La estimulación del factor de crecimiento de células lleva a la activación de sus receptores cognados en la membrana celular que sucesivamente se asocian con y activan las moléculas de señalización intracelular tal como PI 3-quinasa. La activación de la PI 3-quinasa (que consiste en una subunidad regulatoria p85 y una catalítica p110) da por resultado la activación de Akt por fosforilación, soportando así las respuestas celulares

tales como proliferación, supervivencia o migración más abajo. PTEN es así un supresor tumoral que está implicado en la ruta de la fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa y que se ha estudiado extensamente en el pasado por su papel en la regulación del crecimiento y transformación celular (para revisiones véase, Stein, R.C. y Waterfield, M.D. (2000). PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* 6, 347-357; Vázquez, F y Sellers, W.R. (2000). The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signalling. *Biochim Biophys Acta* 1470, M21-35; Roymans, D. y Slegers, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur. J Biochem* 268, 487-498). El supresor tumoral PTEN funciona como un regulador negativo de la PI 3-quinasa revirtiendo la reacción catalizada por PI 3-quinasa y asegurando así que la activación de la ruta se da de una forma transitoria y controlada. La hiperactivación crónica de la señalización de la PI 3-quinasa está provocada por la inactivación funcional de PTEN. La actividad de la PI 3-quinasa puede bloquearse por adición del inhibidor de molécula pequeña LY294002. La actividad y las respuestas posteriores de la quinasa de señalización MEK que actúa en una ruta paralela, puede por ejemplo, inhibirse mediante el inhibidor de molécula pequeña PD98059.

Una activación crónica de la ruta de la PI 3-quinasa a través de la pérdida de la función PTEN es un contribuyente principal a la tumorigénesis y metástasis que indica que este supresor tumoral representa un control importante para una proliferación celular controlada. Las células con desactivación de PTEN muestran características similares a las células en que la ruta de la PI 3-quinasa se ha inducido de forma crónica por medio de formas activadas de PI 3-quinasa (Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., y Pandolfi, P.P. (1998). PTEN is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19, 348-355. Klippel, A., Escobedo, M.A., Wachowicz, M.S., Apell, G., Brown, T.W., Giedlin, M.A., Kavanaugh, W.M. y Williams, L.T. (1998). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* 18, 5699-5711. Kobayashi, M., Nagata, S., Iwasaki, T., Yanagihara, K., Saitoh, I., Karouji, Y., Ihara, S. y Fukui, Y. (1999). Dedifferentiation of adenocarcinomas by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4874-4879).

El PTEN está implicado en diversas rutas a las que también se las denomina como rutas relacionadas con PTEN tal como la ruta PI3K/PTEN, la ruta Akt, el bucle autocrino relacionado con EGF y la ruta mTOR. Una ruta PI3-quinasa es, de hecho, cualquier ruta que implica la PI 3-quinasa, o bien directa o indirectamente. La PI 3-quinasa puede actuar o bien como un inhibidor o como un activador en dicha ruta, o puede regularse como tal por otros elementos de la ruta.

Hay abundancia de técnicas anteriores que describen enfermedades y procesos que implican la ruta de la PI 3-quinasa. Cualquiera de estos procesos y enfermedades puede así estar tratados por los métodos inventivos y los fármacos y agentes diagnósticos cuyo diseño, cribado o fabricación se enseña en este documento. Por razones de ilustración aunque no limitación, se refiere a lo siguiente: cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, cánceres endometriales, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata (Ali, I.U., *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, núm. 11, 7 de Junio de 2000, página 861-863), síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos) (MacLeod, K., *supra*), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley (BRR), lesiones mucocutáneas (por ejemplo triquilemomas), macrocefalia, retraso mental, hamartomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso y cánceres de mama y tiroides (Vázquez, F., Sellers, W.R., *supra*).

En vista de esto, la proteína quinasa N beta es una valiosa diana de fármaco posterior de la ruta de la PI 3-quinasa que puede tratarse por fármacos que tendrán menos efectos secundarios que otros fármacos dirigidos a dianas anteriores de proteína quinasa N beta. En este grado, la presente invención proporciona una diana de fármaco que es adecuada para el diseño, cribado, desarrollo y fabricación de compuestos farmacéuticamente activos que son más selectivos que aquellos conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, LY 294002. Teniendo el control sobre esta fracción particular de las moléculas inductoras, es decir, la proteína quinasa N beta o cualquier molécula posterior adicional implicada en la ruta, solo un número muy limitado de ramificaciones paralelas de la misma o dianas anteriores adicionales en la cascada de señalización, es probable que provoquen efectos indeseados. Por lo tanto, las otras actividades de la ruta de PI 3-quinasa/PTEN relacionadas con el ciclo celular, reparación de ADN, apoptosis, transporte de glucosa, translación, no estarán influidas. Además, la señalización de insulina no está inducida, lo que significa que las respuestas diabéticas u otros efectos secundarios observados en conexión con el uso de LY294002 se evitan realmente. El LY294002 (2-(4-morfolinil)8-fenil-cromona) es uno de varios inhibidores de moléculas pequeñas derivados de cromona desarrollados por Lilly Research Laboratories (Indianápolis) como un inhibidor para la PI-3K (Vlahos *et al.* 1994, *JBC* 269, 5241-5248). Dirige su subunidad catalítica de la molécula PI-3K, p110 y funciona compitiendo con el ADP enlazando en el centro catalítico. Sin embargo, LY294002 no puede distinguir entre diferentes isoformas de p110 (alfa, beta, gamma, delta) que se sugiere que tienen diferentes funciones celulares.

La proteína quinasa N beta es también más posterior a mTOR que se trata por rapamicina. mTOR (Diana De Rapamicina en mamíferos), conocido también como Raft o FRAP, actúa después de la PI 3-quinasa para regular los procesos tales como la entrada dependiente de pp70S6-quinasa en el ciclo celular. mTOR actúa como un sensor para que la disponibilidad del factor de crecimiento y nutriente controle la translación a través de la activación de pp70S6-quinasa y el factor de iniciación 4E. La función de mTOR se inhibe por el macrólido bacteriano rapamicina que bloquea el crecimiento de las células T y ciertas células tumorales (Kuruvilla y Schreiber 1999, *Chemistry & Biology* 6, R129-R136).

## ES 2 319 894 T3

El hecho de que la rapamicina y sus derivados sean fármacos adecuados que se usan habitualmente en la clínica prueba que una diana de fármaco es la más útil y tiene los menores efectos secundarios, es la más específica para un mecanismo molecular particular como, por ejemplo, se demuestra por Yu *et al.*, (Yu, K. *et al.* (2001) *Endocrine-RelatCanc* 8, 249).

5

La proteína quinasa N beta es un miembro de la familia de proteína quinasa C, todas las cuales se dice que son proteína-serina/treonina quinasas. Típicamente, esta clase de proteína quinasa comprende una subunidad regulatoria y una catalítica y usa iones calcio y fosfolípidos como co-factores. Los diacil-gliceroles actúan como activadores de esta clase de familia de proteína quinasa. Los miembros de la familia de proteína quinasa C están implicados en varias rutas de señalización unidas a hormonas o neurotransmisores. Estas proteína-quinasa regulan la actividad de sus proteínas diana por fosforilación. Se sabe en la técnica que la activación continuada no fisiológica de la proteína quinasa C da por resultado el fenotipo celular transformado que puede llevar a la generación de cáncer.

10

La secuencia completa de la proteína quinasa N beta como mRNA está disponible en las bases de datos, por ejemplo, bajo los números de acceso gi 7019488 o NM\_013355. Usando el código genético, la secuencia particular de aminoácidos puede deducirse a partir de este mRNA. Además, la secuencia de aminoácidos de la proteína quinasa N beta está disponible en las bases de datos bajo el número de acceso gi 7019489 o NP\_037487.1. Está dentro de la presente invención que derivados o versiones truncadas de la misma puedan usarse según la presente invención mientras los efectos deseados puedan llevarse a cabo. La extensión de derivación y truncado puede así determinarse por un experto en la técnica por análisis rutinario. Cuando llega a secuencias de ácido nucleico, esas secuencias de ácido nucleico también están comprendidas por el término secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína quinasa N beta que se hibridan al ácido nucleico especificado por los números de acceso mencionados anteriormente o cualquier secuencia de ácido nucleico que pueda derivarse de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente. Dicha hibridación se conoce por el experto en la técnica. Las particularidades de dicha hibridación pueden tomarse de Sambrook, J. Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. En una realización preferida, la hibridación es una hibridación bajo condiciones astringentes. Además, un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta es también una secuencia de ácido nucleico que es homóloga a cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente, por lo cual el grado de homología es preferiblemente 75, 80, 85, 90 o 95%. Referencias adicionales relacionadas a la proteína quinasa N beta son, entre otras, Shibata H. *et al.*, *J. Biochem. (Tokio)* Julio de 2001; 130(1):23-31; Dong, LQ, *Proc Natl Akad Scie USA*, 9 de Mayo de 2000; 97(10):5089-5094; y Oishi, K., *Biochem Biophys Res Commun*. 11 de Agosto de 1999; 261(3):808-814.

15

20

25

30

Pueden encontrarse homólogos a la proteína quinasa N beta humana, entre otros, en *M. musculus*, *R. norvegicus*, *A. thaliana*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y *S. cerevisiae*. El porcentaje de identidad y longitud de la región alineada es 67% y 279 aminoácidos, 51% y 866 aminoácidos, 38% y 305 aminoácidos, 36% y 861 aminoácidos, 63% y 296 aminoácidos y 44% y 362 aminoácidos respectivamente, para las diversas especies mencionadas anteriormente. Se sabrá por los expertos en la técnica que cualquiera de estos u otros homólogos serán adecuados en principio para la práctica de la presente invención a menos que el fármaco o agente diagnóstico generado usando dicho homólogo pueda aún interactuar con la proteína quinasa N beta humana o cualquier otra proteína quinasa N beta prevista.

35

40

La secuencia humana de aminoácidos puede tomarse también de ProtEST, número de acceso pir: JC7083, donde la respectiva proteína quinasa N beta se la denomina como proteína quinasa JC7083. El gen para la proteína quinasa N beta humana está localizado en el cromosoma humano número 9. Las fuentes de cADN para la proteína quinasa N beta son en general un número de cánceres y diversos tejidos fetales o embrionarios, más particularmente, entre otros, de estómago, adenocarcinoma, cerebro, mama, linfoma de Burkitt, cuello del útero, condrosarcoma, colon, ojos fetales, lentes fetales, segmento anterior del ojo fetal, nervio óptico fetal, retina fetal, fovea de retina fetal, coroides fetal, macular fetal, fibroteoma, línea germinal, cuello ancho, corazón, riñón, carcinoma de células grandes, leiomiocarcinoma, condrosarcoma metastático, ovario, paratiroide, retinoblastoma, rabiomiocarcinoma, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células escamosas, testículo y útero. De esta lista, es obvio que el fármaco al que también se denomina en este documento como un medicamento, y el agente diagnóstico, que incluye un agente de formación de etapas, es decir, un agente que puede usarse para diferenciar el estado de un paciente con respecto a la etapa de una enfermedad de la que puede sufrir, además de para monitorizar la eficacia de un tratamiento aplicado a un paciente, respectivamente, que se diseña, criba o fabrica según la enseñanza técnica dada en este documento, puede además de en cualquiera de las otras enfermedades como se describen en este documento y los procesos enfermos como se describen en este documento, usarse también para el tratamiento, prevención, diagnosis, pronóstico y monitorización de estas enfermedades o cualquier enfermedad que implica las células, tejidos u órganos específicos. Estas enfermedades y procesos enfermos también estarán comprendidos por el término "enfermedad como se describe en este documento".

45

50

55

En vista de los sorprendentes descubrimientos descritos en este documento, la proteína quinasa N beta como tal puede usarse para la fabricación de un agente diagnóstico.

60

La proteína quinasa N beta puede usarse como el compuesto contra el que se dirigen los compuestos químicos que pueden usarse como fármacos o candidatos a fármaco o como agentes diagnósticos. Estos compuestos químicos pertenecen a diferentes clases de compuestos tales como anticuerpos, péptidos, anticinas, aptómeros, spiegelmeros, ribozimas, oligonucleótidos antisentido y siARN además de moléculas pequeñas. Los compuestos se diseñan, seleccionan, criban, generan y/o fabrican usando o bien la proteína quinasa N beta en si misma como una entidad física o química, o información relacionada con la proteína quinasa N beta. En el proceso de diseño, selección, cribado,

65

generación y/o fabricación de dichas clases de compuestos, también se denominará a la proteína quinasa N beta como la diana que se usa en el proceso más que en la aplicación final del respectivo compuesto a un paciente que lo necesita. En los procesos que proporcionan las diversas clases de compuestos, pueden usarse o bien la proteína quinasa N beta, también denominada en este documento como proteína quinasa N beta o un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta. El término proteína quinasa N beta como se usa en este documento comprende cualquier fragmento o derivado de la proteína quinasa N beta que permite el diseño, selección, cribado, generación y/o fabricación de dichas clases de compuestos de la(s) respectiva(s) clase(s) de compuestos que sucesivamente están/está en sus/su aplicación como un medicamento o como un agente diagnóstico activo como tal. El término ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta como se usa en este documento, comprenderá cualquier ácido nucleico que contiene un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta como se define anteriormente, o una parte de la misma. Una parte de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta se considera como tal mientras sea aún adecuada para el diseño, selección, cribado, generación y/o fabricación de dichas clases de compuestos que sucesivamente están/está en sus/su aplicación como un medicamento o como un agente diagnóstico activo como tal. El ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta puede ser ácido nucleico genómico, hnARN, mARN, cADN o parte de cada uno de ellos.

Está dentro de la presente invención que medios o compuestos diferentes de la proteína quinasa N beta o una secuencia de ácido nucleico de ésta pueden usarse para crear o suprimir los efectos que surgen de la proteína quinasa N beta o del ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta. Dichos medios pueden determinarse o seleccionarse en un método de cribado. En dicho método de cribado, una primera etapa es proporcionar uno o varios de los llamados compuestos candidato. Los compuestos candidato como se usan en este documento son compuestos cuya idoneidad se va a ensayar en un sistema de ensayo para tratar o aliviar las diversas enfermedades como se describen en este documento y procesos enfermos como se describen en este documento, o van a usarse como un medio o agente diagnóstico para esta clase de enfermedades o procesos enfermos. Si un compuesto candidato muestra un respectivo efecto en un sistema de ensayo, dicho compuesto candidato es un medio o agente adecuado para el tratamiento de dichas enfermedades o procesos enfermos y, en principio, además un agente diagnóstico adecuado para dichas enfermedades y procesos enfermos. En una segunda etapa, el compuesto candidato se pone en contacto con un sistema de expresión de proteína quinasa N beta o un producto génico de proteína quinasa N beta, preferiblemente un producto de expresión génica respectivo, tal como un hnARN o mARN, o un sistema de actividad de proteína quinasa N beta o una proteína quinasa N beta. Al sistema de actividad de la proteína quinasa N beta también se le denomina en este documento como y/o es también preferiblemente activo en el significado de un sistema que detecta la actividad de la proteína quinasa N beta.

Un sistema de expresión de la proteína quinasa N beta es básicamente un sistema de expresión que muestra o expone la expresión de la proteína quinasa N beta, por lo cual la extensión o nivel de expresión básicamente puede cambiarse. Preferiblemente, un sistema de actividad de una proteína quinasa N beta es esencialmente un sistema de expresión por el cual se mide la actividad o condición de actividad más que la expresión de la proteína quinasa N beta. De manera alternativa, un sistema de actividad de una proteína quinasa N beta es una proteína quinasa N beta cuya actividad puede medirse o un sistema que proporciona o comprende una proteína quinasa N beta. En cualquiera de estos sistemas se ensaya si bajo la influencia de un compuesto candidato la actividad de la proteína quinasa N beta o del ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta es diferente de la situación sin el compuesto candidato. Sin importar si el sistema particular es o bien un sistema de expresión o un sistema de actividad, está en el alcance de la presente invención que puede darse y puede medirse o bien un aumento o una disminución de la actividad y la expresión, respectivamente. Típicamente, el sistema de expresión y/o sistema de actividad es una reacción *in vitro*, tal como un extracto celular o una fracción del extracto celular tal como un extracto nuclear. Un sistema de expresión de la proteína quinasa N beta como se usa en este documento, puede ser también una célula, preferiblemente una célula de un tejido u órgano implicado en las enfermedades como se describen en este documento y procesos enfermos como se describen en este documento.

Si hay un aumento o disminución en el sistema de actividad o sistema de expresión, puede determinarse en cada nivel de la expresión, por ejemplo midiendo el aumento o disminución de la cantidad de ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, más particularmente mARN, o el aumento o disminución de la proteína quinasa N beta expresada bajo la influencia del compuesto candidato. Las técnicas necesarias para la medida, más particularmente la medida cuantitativa de este tipo de cambios, tal como para el mARN o la proteína, se conocen por el experto en la técnica. Son también conocidos por el experto en la técnica los métodos para determinar la cantidad de o contenido de proteína quinasa N beta, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos apropiados. Los anticuerpos pueden generarse como sabe el experto en la técnica y se describe, por ejemplo, por Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988).

En el caso de un sistema de expresión de proteína quinasa N beta, un aumento o disminución de la actividad de la proteína quinasa N beta puede determinarse, preferiblemente en un ensayo funcional.

Poner en contacto el compuesto candidato y el sistema de expresión y el sistema de actividad, respectivamente, se lleva a cabo normalmente añadiendo una disolución acuosa del compuesto candidato a un respectivo sistema de reacción al que se denomina generalmente en este documento como sistema de ensayo. Además de disoluciones acuosas, también pueden usarse suspensiones o disoluciones del compuesto candidato en disolventes orgánicos. La disolución acuosa es preferiblemente una disolución tampón.

Preferiblemente, en cada marcha que usa el sistema de expresión y el sistema de actividad, respectivamente, solo se usa un único compuesto candidato. Sin embargo, también está dentro de la presente invención que varias de estas clases de ensayos se lleven a cabo en paralelo en un sistema de alto rendimiento.

5 Una etapa adicional en el método según la presente invención radica en determinar si bajo la influencia del compuesto candidato la expresión o actividad del sistema de expresión y del sistema de actividad, respectivamente, en relación a la proteína quinasa N beta o un ácido nucleico que la codifica, por lo tanto se cambia. Típicamente esto se hace comparando la reacción del sistema en la adición del compuesto candidato respecto a uno sin adición del compuesto candidato. Preferiblemente, el compuesto candidato es un miembro de una biblioteca de compuestos.

10 Básicamente, cualquier biblioteca de compuestos es adecuada para el propósito de esta invención a pesar de la clase de compuestos. Bibliotecas adecuadas de compuestos son, entre otras, bibliotecas compuestas de pequeñas moléculas, de péptidos, proteínas, anticuerpos, anticinas y ácidos nucleicos funcionales. Los últimos compuestos pueden generarse como sabe un experto en la técnica y se esboza en este documento.

15 La fabricación de un anticuerpo específico para la proteína de proteína quinasa N beta o para el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, se conoce por un experto en la técnica y, por ejemplo, se describe en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988). Preferiblemente, pueden usarse anticuerpos monoclonales en conexión con la presente invención, que pueden fabricarse según el protocolo de Cesar y Milstein y desarrollos adicionales basados en él. Los anticuerpos como se usan en este documento, incluyen, aunque no están limitados a, anticuerpos completos, fragmentos o derivados de anticuerpo tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc y anticuerpos de una sola hebra, mientras sean adecuados y capaces de enlazar con la proteína quinasa N beta. Aparte de los anticuerpos monoclonales, también pueden usarse y/o generarse anticuerpos policlonales. La generación de anticuerpos policlonales también se conoce por un experto en la técnica y, por ejemplo, se describe en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988). Preferiblemente, los anticuerpos usados para propósitos terapéuticos son anticuerpos humanizados o humanos como se define anteriormente.

30 Los anticuerpos que pueden usarse según la presente invención pueden tener uno o varios marcadores o etiquetas. Dichos marcadores o etiquetas pueden ser útiles para detectar el anticuerpo o bien en su aplicación diagnóstica o en su aplicación terapéutica. Preferiblemente los marcadores y etiquetas se seleccionan del grupo que comprende avidina, estreptavidina, biotina, oro y fluoresceína y se usan, por ejemplo, en métodos ELISA. Estos y otros marcadores además de métodos se describen, por ejemplo en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1998).

35 También está dentro de la presente invención que la etiqueta o marcador muestre una función adicional aparte de la detección, tal como la interacción con otras moléculas. Dicha interacción puede ser, por ejemplo, la interacción específica con otros compuestos. Estos otros compuestos pueden ser o bien aquellos inherentes al sistema donde se usa el anticuerpo tal como el cuerpo humano o animal, o la muestra que se analiza usando el respectivo anticuerpo. Los marcadores apropiados pueden ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína con asociados de interacción específica de los mismos como avidina y estreptavidina y similares, estando presente en el respectivo compuesto o estructura para interactuar con el anticuerpo así marcado o etiquetado.

45 Una clase adicional de medicamentos además de agentes diagnósticos que pueden generarse usando la proteína de la proteína quinasa N beta o el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa beta, son péptidos que se enlazan a ella. Dichos péptidos pueden generarse usando métodos según el estado de la técnica tal como la expresión in vivo. Básicamente, se genera una biblioteca de péptidos, tal como en forma de fagos, y esta clase de bibliotecas se pone en contacto con la molécula diana, en el presente caso, por ejemplo, la proteína quinasa N beta. Esos péptidos enlazados a la molécula diana se eliminan posteriormente, preferiblemente como un complejo con la molécula diana, de la respectiva reacción. Es sabido por un experto en la técnica que las características de enlace, al menos a una cierta extensión, dependen del sistema experimental particularmente realizado tal como la concentración de sal y similares. Después de separar esos péptidos enlazados a la molécula diana con una mayor afinidad o una mayor fuerza, de los miembros no enlazados de la biblioteca, y opcionalmente también después de la eliminación de la molécula diana del complejo de la molécula diana y péptido, el(los) respectivo(s) péptido(s) puede(n) caracterizarse posteriormente. Antes de la caracterización se realiza opcionalmente una etapa de amplificación tal como, por ejemplo, propagando el péptido que codifica los fagos. La caracterización comprende preferiblemente la secuenciación de la diana que enlaza a los péptidos. Básicamente, los péptidos no están limitados en sus longitudes, sin embargo, preferiblemente los péptidos que tienen unas longitudes de aproximadamente 8 a 20 aminoácidos se obtienen preferiblemente en los respectivos métodos. El tamaño de las bibliotecas puede ser aproximadamente de  $10^2$  a  $10^{18}$ , preferiblemente de  $10^8$  a  $10^{15}$  péptidos diferentes, sin embargo, no está limitado a esto.

60 Una forma particular de diana que enlaza polipéptidos son las llamadas "anticinas" que están descritos, entre otros, en la Solicitud de Patente Alemana DE 197 42 706.

65 Según la presente invención, la proteína de la proteína quinasa N beta además del ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta puede usarse como la diana para la fabricación o desarrollo de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades descritas en este documento y de los procesos enfermos descritos en este documento, además de para la fabricación y/o desarrollo de medios para la diagnosis de dichas enfermedades y dichos procesos, en un proceso de cribado, por lo cual se usan en el proceso de cribado moléculas pequeñas o bibliotecas de moléculas

pequeñas. Este cribado comprende la etapa de puesta en contacto de la molécula diana con una única molécula pequeña o una variedad de moléculas pequeñas a la vez o posteriormente, preferiblemente aquellas de la biblioteca como se especifica anteriormente, e identificación de esas moléculas pequeñas o miembros de la biblioteca que enlazan a las moléculas diana que, si se criban en conexión con otras moléculas pequeñas pueden separarse de las moléculas pequeñas que no enlazan o no interactúan. Se conocerá que el enlace y el no enlace pueden influirse fuertemente por el sistema experimental particular. En la modificación de la astringencia de los parámetros de reacción es posible variar el grado de enlace y no enlace que permite una operación de ajuste de este proceso de cribado. Preferiblemente, después de la identificación de una o varias moléculas pequeñas que interactúan específicamente con la molécula diana, esta molécula puede caracterizarse adicionalmente. Esta caracterización adicional puede radicar en, por ejemplo, la identificación de la molécula pequeña y la determinación de su estructura molecular y características físicas, químicas, biológicas y/o médicas adicionales. Preferiblemente, los compuestos naturales tienen un peso molecular de aproximadamente 100 a 1000 Da. También preferiblemente, las moléculas pequeñas son aquellas que cumplen con las reglas de Lepinsky de cinco conocidas por los expertos en la técnica. De manera alternativa, las moléculas pequeñas pueden definirse también de manera que sean moléculas pequeñas sintéticas, preferiblemente que surgen de la química combinatoria, en contraste con los productos naturales que son preferiblemente no sintéticos. Sin embargo, tiene que anotarse que estas definiciones son solo subsidiarias del entendimiento general de los respectivos términos en la técnica.

También está dentro de la presente invención el uso de la proteína quinasa N beta y/o un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta como una molécula diana para la fabricación o selección de aptómeros y spiegelmeros que pueden usarse entonces directa o indirectamente o bien como medicamento o como agentes diagnósticos.

Los aptómeros son ácidos D-nucleicos que o bien tienen una sola hebra o tienen una doble hebra y que interactúan específicamente con una molécula diana. La fabricación o selección de aptómeros se describe, por ejemplo, en la patente Europea EP 0 533 838. Básicamente, se realizan las siguientes etapas. Primero, una mezcla de ácidos nucleicos, es decir, aptómeros potenciales, se proporciona, por lo cual cada ácido nucleico comprende típicamente un segmento de varios, preferiblemente al menos ocho nucleótidos posteriormente distribuidos al azar. Esta mezcla se pone en contacto posteriormente con la molécula diana por lo cual el(los) ácido(s) nucleico(s) se enlaza(n) a la molécula diana, tal como en base a una afinidad aumentada hacia la diana o con una mayor fuerza hacia ella, en comparación con la mezcla candidata. El(los) ácido(s) nucleico(s) de enlace se separa(n) posteriormente del resto de la mezcla. Opcionalmente, el(los) ácido(s) nucleico(s) así obtenido(s) se amplifica(n) usando, por ejemplo, la reacción de la cadena polimerasa. Estas etapas pueden repetirse varias veces dando al final una mezcla que tiene una relación aumentada de ácidos nucleicos que enlazan específicamente a la diana de la que se selecciona entonces opcionalmente el ácido nucleico final que se enlaza. A este(os) ácido(s) nucleico(s) que se enlaza(n) específicamente se denominan aptómeros. Es obvio que a cualquier etapa del método para la generación o identificación de los aptómeros, pueden tomarse muestras de la mezcla de ácidos nucleicos individuales para determinar la secuencia de los mismos usando técnicas estándar. Está dentro de la presente invención que los aptómeros pueden estabilizarse tal como, por ejemplo, introduciendo grupos químicos definidos que se conocen por el experto en la técnica de generación de aptómeros. Dicha modificación puede por ejemplo radicar en la introducción de un grupo amino en la posición 2' del resto azúcar de los nucleótidos. Los aptómeros se usan habitualmente como agentes terapéuticos. Sin embargo, también está dentro de la presente invención que los aptómeros así seleccionados o generados pueden usarse para la validación de la diana y/o como sustancia de partida para el desarrollo de medicamentos, preferiblemente de medicamentos basados en moléculas pequeñas. Esto se hace en realidad mediante un ensayo de competición por el cual la interacción específica entre la molécula diana y el aptómero se inhibe por un fármaco candidato por el cual, por sustitución del aptómero del complejo de diana y aptómero, puede asumirse que el candidato a fármaco respectivo permite una inhibición específica de la interacción entre la diana y el aptómero, y si la interacción es específica, dicho fármaco candidato será adecuado, al menos en principio, para bloquear la diana y disminuir así su disponibilidad o actividad biológica en un respectivo sistema que comprende dicha diana. La molécula pequeña así obtenida puede someterse entonces a una derivación y modificación adicional para optimizar sus características físicas, químicas, biológicas y/o médicas tales como toxicidad, especificidad, biodegradación y biodisponibilidad.

La generación o fabricación de spiegelmeros que pueden usarse o generarse según la presente invención usando proteína quinasa N beta o un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, se basa en un principio similar. La fabricación de spiegelmeros se describe en la solicitud de patente internacional WO 98/08856. Los spiegelmeros son ácidos L-nucleicos, lo que significa que están compuestos de L-nucleótidos más que los aptómeros que están compuestos de D-nucleótidos como lo están los aptómeros. Los spiegelmeros se caracterizan por el hecho de que tienen una estabilidad muy alta en el sistema biológico y, en comparación a los aptómeros, interactúan específicamente con la molécula diana contra la que se dirigen. Con el propósito de generar spiegelmeros, se crea una población heterogénea de ácidos D-nucleicos y esta población se pone en contacto con la antípoda óptica de la molécula diana, en el presente caso por ejemplo con el D-enantiómero del L-enantiómero que se da de forma natural de la proteína quinasa N beta. Posteriormente, esos ácidos D-nucleicos se separan, los cuales no interactúan con la antípoda óptica de la molécula diana. Sin embargo, esos ácidos D-nucleicos que interactúan con la antípoda óptica de la molécula diana se separan, se determinan opcionalmente y/o se secuencian y posteriormente los ácidos L-nucleicos correspondientes se sintetizan en base a la información de la secuencia de ácidos nucleicos obtenida de los ácidos D-nucleicos. Estos ácidos L-nucleicos que son idénticos en términos de secuencia con los ácidos D-nucleicos mencionados anteriormente que interactúan con la antípoda óptica de la molécula diana, interactuarán específicamente con la molécula diana que se da de forma natural más que con la antípoda óptica de la misma. Similar al método para la generación de aptómeros, también es posible repetir las diversas etapas varias veces y así enriquecer esos ácidos nucleicos que interactúan de forma específica con la antípoda óptica de la molécula diana.

## ES 2 319 894 T3

Una clase adicional de compuestos que puede fabricarse o generarse en base a la proteína quinasa N beta o un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa beta, como la molécula diana como se describe en este documento, son ribozimas, oligonucleótidos antisentido y siARN.

5 Es una característica común de todos los ácidos nucleicos mencionados anteriormente que no interactúan con la molécula diana al nivel del producto de translación que es en el presente caso la proteína quinasa N beta, aunque interactúan bastante con el producto de transcripción, es decir, el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa beta tal como el ácido nucleico genómico o cualquier ácido nucleico derivado del mismo tal como los correspondientes hnARN, cADN y mARN, respectivamente. En el grado de lo posible, la molécula diana de la clase de compuestos  
10 mencionada anteriormente es preferiblemente el mARN de la proteína quinasa N beta.

Los ribozimas son ácidos nucleicos catalíticamente activos que consisten preferiblemente en ARN que comprende básicamente dos restos. El primer resto muestra una actividad catalítica mientras el segundo resto es responsable de la interacción específica con el ácido nucleico diana, en el presente caso el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta. En la interacción entre el ácido nucleico diana y el segundo resto del ribozima, típicamente por hibridación y apareamiento de bases de Watson-Crick de segmentos de bases esencialmente complementarias en las dos hebras de hibridación, el resto catalíticamente activo puede volverse activo, lo que significa que cataliza, o bien intramolecular o intermolecularmente, el ácido nucleico diana en el caso de que la actividad catalítica del ribozima sea una actividad fosfodiesterasa. Posteriormente, puede haber una degradación adicional del ácido nucleico diana que al final da por resultado la degradación del ácido nucleico diana además de la proteína derivada de dicho ácido nucleico diana que en el presente caso es la proteína quinasa N beta, debido a la falta de proteína quinasa N beta nuevamente sintetizada y una vuelta de la proteína quinasa N beta previamente existente. Los ribozimas, sus principios de uso y diseño, se conocen por un experto en la técnica y, por ejemplo, se describen en Doherty y Doudna (Ribozym structures and mechanism. Annu ref. Biophys. Biomolstruct. 2001; 30:457-75) y Lewin y Hauswirth (Ribozyme Gene Therapy: Applications for  
25 molecular medicine. 2001 7:221-8).

El uso de oligonucleótidos antisentido para la fabricación de un medicamento y como un agente diagnóstico, respectivamente, se basa en un modo de acción similar. Básicamente, los oligonucleótidos antisentido hibridan en base a la complementariedad de bases, con un ARN diana, preferiblemente con un mARN, así activan la RNasa H. La RNasa H se activa por ADN acoplado tanto con fosfodiéster como con fosforotioato. El ADN acoplado con fosfodiéster, sin embargo, se degrada rápidamente por nucleasas celulares con la excepción de ADN acoplado con fosforotioato. Estos derivados de ADN resistentes, que no se dan de forma natural, no inhiben la RNasa H en la hibridación con ARN. En otras palabras, los polinucleótidos antisentido solo son eficaces como complejos híbridos de ADN ARN. Se describen ejemplos de esta clase de oligonucleótidos antisentido, entre otras, en las patentes de EE.UU. US 5.849.902 y US 5.989.912. En otras palabras, en base a la secuencia de ácido nucleico de la molécula diana que en el presente caso es el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, o bien a partir de la proteína diana a partir de la que una respectiva secuencia de ácido nucleico puede deducirse en principio, o por conocimiento de la secuencia de ácido nucleico como tal, particularmente el mARN, pueden diseñarse oligonucleótidos antisentido adecuados en base al principio de complementariedad de bases.

40 Se prefieren particularmente oligonucleótidos antisentido que tienen un segmento corto de ADN fosforotioato (3 a 9 bases). Se necesita un mínimo de 3 bases de ADN para la activación de la RNasa H bacteriana y se necesita un mínimo de 5 bases para la activación de la RNasa H de los mamíferos. En estos oligonucleótidos quiméricos hay una región central que forma un sustrato para la RNasa H que está flanqueada por "brazos" de hibridación comprendidos por nucleótidos modificados que no forman sustratos para la RNasa H. Los brazos de hibridación de los oligonucleótidos quiméricos pueden modificarse tal como por 2'-O-metilo o 2'-fluoro. Propuestas alternativas usaron uniones metilfosfonato o fosforamidato en dichos brazos. Realizaciones adicionales del oligonucleótido antisentido útiles en la práctica de la presente invención son P-metoxioligonucleótidos, P-metoxioligodesoxirribonucleótidos parciales o P-metoxioligonucleótidos.

50 De particular relevancia y utilidad para la presente invención son aquellos oligonucleótidos antisentido como se describen más particularmente en las dos patentes de EE.UU. mencionadas anteriormente. Estos oligonucleótidos contienen nucleótidos con unión 5'→3' que no se dan de forma natural. Más bien, los oligonucleótidos tienen dos tipos de nucleótidos: 2'-desoxifosforotioato, que activa la RNasa H, y nucleótidos 2'-modificados, que no lo hacen. Las uniones entre los nucleótidos 2'-modificados pueden ser fosfodiésteres, fosforotioato o P-etoxifosfodiéster. La activación de RNasa H se consigue mediante una región contigua que activa la RNasa H, que contiene entre 3 y 5 nucleótidos de 2'-desoxifosforotioato para activar la RNasa H bacteriana y entre 5 y 10 nucleótidos de 2'-desoxifosforotioato para activar la RNasa H eucariótica y, particularmente, la de mamíferos. La protección de la degradación se consigue haciendo a las bases 5' y 3' terminales altamente resistentes a la nucleasa y, opcionalmente, colocando un grupo bloqueante 3'-terminal.

60 Más particularmente, el oligonucleótido antisentido comprende un extremo 5' y un extremo 3'; y de 11 a 59 nucleótidos unidos 5'→3' seleccionados independientemente del grupo que consiste en nucleótidos fosfodiéster 2'-modificados y nucleótidos P-alquiloxifosfotriéster 2'-modificados; y en el que el nucleósido 5'-terminal está unido a una región de activación de RNasa H de entre tres y diez desoxirribonucleótidos contiguos unidos a fosforotioato, y en el que el extremo 3' de dicho oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en un desoxirribonucleótido invertido, un segmento contiguo de uno a tres ribonucleótidos fosforotioato 2'-modificados, un grupo biotina y un nucleótido P-alquiloxifosfotriéster.

## ES 2 319 894 T3

También puede usarse un oligonucleótido antisentido en el que el nucleósido 5' terminal no está unido a una región de activación de RNasa H, sino el nucleósido 3' terminal como se especifica anteriormente. Además, el extremo 5' se selecciona del grupo particular más que el extremo 3' de dicho oligonucleótido.

5 Oligonucleótidos antisentido adecuados y útiles son también aquellos que comprenden una región de activación de la RNasa H 5' terminal y que tienen entre 5 y 10 nucleótidos desoxifosforotioato contiguos; entre 11 a 59 2'-metoxirribonucleótidos con unión 5'→3' contiguos; y un grupo de bloqueo de la exonucleasa presente en el extremo 3' del oligonucleótido que se saca del grupo que consiste en un nucleótido unido a un no-5'-3'-fosfodiéster, de uno a tres nucleótidos modificados 5'-3'-unidos y un grupo de bloqueo químico no nucleótido.

10 Pueden caracterizarse dos clases de oligonucleótidos antisentido particularmente preferidos como sigue:

15 La primera clase de oligonucleótidos antisentido, también denominada en este documento como segunda generación de oligonucleótidos antisentido, comprende un total de 23 nucleótidos que comprende en la dirección 5'→3' un segmento de siete 2'-O-metil-ribonucleótidos, un segmento de nueve 2'-desoxirribonucleótidos, un segmento de seis 2'-O-metil-ribonucleótidos y un 2'-desoxirribonucleótido 3'-terminal. Del primer grupo de siete 2'-O-metil-ribonucleótidos, los cuatro primeros están unidos a fosforotioato, mientras los posteriores cuatro 2'-O-metil-ribonucleótidos están unidos a fosfodiéster. Además, hay una unión fosfodiéster entre el último, es decir, el extremo más 3'-terminal de los 2'-O-metil-ribonucleótidos y el primer nucleótido del segmento que consiste en nueve 2'-desoxirribonucleótidos. Todos los 2'-desoxirribonucleótidos están unidos a fosforotioato. Una unión fosforotioato también está presente entre el último, es decir, el 2'-desoxinucleótido más 3'-terminal, y el primer 2'-O-metil-ribonucleótido del segmento posterior que consiste en seis 2'-O-metil-ribonucleótidos. De este grupo de seis 2'-O-metil-ribonucleótidos los cuatro primeros, de nuevo en la dirección 5'→3', están unidos por fosfodiéster, mientras los últimos tres, correspondientes a las posiciones 20 a 22, están unidos por fosforotioato. El último, es decir, el 2'-desoxinucleótido 3'-terminal terminal está unido al último, es decir, el 2'-O-metil-ribonucleótido más 3'-terminal a través de una unión fosforotioato.

25 Esta primera clase puede también describirse por referencia a la siguiente estructura esquemática: RRRnnnnNNN NNNNNnnnRRRN. Por la presente, R indica 2'-O-metil-ribonucleótidos unidos por fosforotioato (A, G, U, C); n significa 2'-O-metil-ribonucleótidos (A, G, U, C); N representa desoxirribonucleótidos unidos por fosforotioato (A, G, T, C).

30 La segunda clase de oligonucleótidos antisentido particularmente preferidos, también denominados en este documento como oligonucleótidos antisentido de tercera generación o GeneBlocs, también comprende un total de 17 a 23 nucleótidos con la siguiente estructura básica (en dirección 5'→3').

35 En el extremo 5'-terminal hay un nucleótido abásico invertido que es una estructura adecuada para conferir resistencia frente a la actividad exonucleasa y, por ejemplo, se describe en el documento WO 99/54459. Este abásico invertido está unido a un segmento de cinco a siete 2'-O-metil-ribonucleótidos que están unidos a fosfodiéster. Después de este segmento de cinco a siete 2'-O-metil-ribonucleótidos hay un segmento de siete a nueve 2'-desoxirribonucleótidos todos los cuales están unidos por fosforotioato. La unión entre el último, es decir, el 2'-O-metil-ribonucleótido más 3'-terminal y el primer 2'-desoxinucleótido del 2'-desoxinucleótido que comprende el segmento se da por medio de una unión fosfodiéster. Adyacente al segmento de siete a nueve 2'-desoxinucleótidos, se conecta un segmento consistente en cinco a siete 2'-O-metil-ribonucleótidos. El último 2'-desoxinucleótido está unido al primer 2'-O-metil-ribonucleótido del último segmento mencionado que consiste en cinco a siete 2'-O-metil-ribonucleótidos que se da por medio de una unión fosforotioato. El segmento de cinco a siete 2'-O-metil-ribonucleótidos está unido por fosfodiéster. En el extremo 3'-terminal del segundo segmento de cinco a siete 2'-O-metil-ribonucleótido se une otro abásico invertido.

40 Esta segunda clase también puede describirse por referencia a la siguiente estructura esquemática: (GeneBlocs que representa la 3ª generación de oligonucleótidos antisentido tiene también la siguiente estructura esquemática:) tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>x</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>y</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>z</sub>-tapón o tapón-nnnnnnnNNNNNNNNnnnnnnn-tapón. Por la presente, el tapón representa abásicos desoxi invertidos o modificaciones similares en ambos extremos; n significa 2'-O-metil-ribonucleótidos (A, G, U, C); N representa desoxirribonucleótidos unidos a fosforotioato (A, G, T, C); x representa un número entero de 5 a 7; y representa un número entero de 7 a 9; y z representa un número entero de 5 a 7.

45 Debe anotarse que los números enteros x, y y z pueden elegirse independientemente uno del otro aunque se prefiere que x y z sean iguales en un oligonucleótido antisentido dado. Por consiguiente, los diseños o estructuras básicos siguientes de oligonucleótidos antisentido de la tercera generación pueden ser como siguen:

<p>50 tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón,</p>	<p>55 tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón</p>	<p>60 tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>5</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>6</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>7</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>8</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón,          tapón-(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>(N<sub>s</sub>)<sub>9</sub>(n<sub>p</sub>)<sub>7</sub>-tapón.</p>
--	---	--

## ES 2 319 894 T3

Una clase adicional de compuestos que pueden generarse en base a la enseñanza técnica dada en este documento y que puede usarse como medicamentos y/o agentes diagnósticos son ARN de interferencia pequeños (siARN) dirigidos al ácido nucleico, preferiblemente mARN, que codifica la proteína quinasa N beta. El siARN es un ARN de hebra doble que tiene típicamente una longitud de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos. La secuencia de una de las dos hebras de ARN corresponde a la secuencia del ácido nucleico diana tal como el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, a degradar. En otras palabras, conociendo la secuencia del ácido nucleico de la molécula diana, en el presente caso la proteína quinasa N beta, preferiblemente la secuencia mARN, puede diseñarse un ARN de hebra doble con una de las dos hebras siendo complementaria a dicho, por ejemplo, mARN de proteína quinasa N beta y, en la aplicación de dicho siARN a un sistema que contiene el gen, ADN genómico, hnARN o mARN que codifica la proteína quinasa N beta, el respectivo ácido nucleico diana se degradará y así el nivel de la respectiva proteína se reduce. Los principios básicos de diseño, construcción y uso de dicho siARN como medicamento y agente diagnóstico, respectivamente, se describe, entre otros, en las solicitudes de patente internacional WO 00/44895 y WO 01/75164.

En base a los principios de diseño mencionados anteriormente, es posible generar dicho siARN, oligonucleótido antisentido y ribozima, respectivamente, una vez que se conoce la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta. Esto es también cierto para moléculas precursoras de ácido nucleico tales como hnARN, cADN y similares, incluyendo ácido nucleico genómico. Por supuesto, también conocer la hebra antisentido respectiva puede permitir el diseño de dichos compuestos basados en ácido nucleico dado el principio básico de complementariedad de pares de bases, preferiblemente en base al emparejamiento de bases de Watson-Crick. Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención está relacionado con siARN, ribozimas y nucleótidos antisentido específicos que se dirigen contra o son específicos para la proteína quinasa N-beta. A continuación, esto se ilustra adicionalmente por siARN, sin embargo, esto se aplica a los oligonucleótidos antisentido y ribozimas también, como se conocerá por los expertos en la técnica.

Dicho siARN comprende preferiblemente una longitud de 15 a 25 nucleótidos, por lo cual esto significa realmente cualquier longitud que comprende 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. En realizaciones adicionales, el siARN puede incluso mostrar más nucleótidos. Según los principios de diseño bien conocidos en la técnica, puede generarse el respectivo siARN. Por consiguiente, el siARN reivindicado en este documento comprende un segmento de preferiblemente cualquier longitud de nucleótidos de 15 a 25 nucleótidos consecutivos que es o bien al menos parcialmente complementario a la hebra en el sentido o el antisentido que codifica la PKN-beta, y una segunda hebra de ribonucleótido que es al menos parcialmente complementaria a la primera y así a la hebra antisentido y hebra en el sentido respectivamente, que codifica la proteína quinasa N-beta. Cualquier principio de diseño conocido en la técnica de generación o fabricación de siARN puede aplicarse a esta clase de estructura dúplex. El espacio de siARN descrito en este documento comprende moléculas siARN cuya hebra antisentido empieza con unos nucleótidos que corresponden al nucleótido núm. 1 de una secuencia de codificación de PKN-beta como se especifica anteriormente. Más de dichas moléculas siARN empiezan con un nucleótido que corresponde al nucleótido núm. 2 de una secuencia de codificación de PKN-beta como se especifica anteriormente, y así. Esta clase de cribado sobre la secuencia de codificación de PKN-beta se repite de manera que proporciona todas las moléculas de siARN posibles que pueden dirigirse contra PKN-beta. La longitud de cualquiera de las moléculas siARN así generadas puede ser cualquier longitud adecuada para el siARN, más particularmente cualquier longitud como se especifica anteriormente. Preferiblemente, las diversas moléculas de siARN del espacio de moléculas de siARN descrito en este documento, se traslapa excepto el nucleótido más 5'-terminal de la hebra antisentido o la hebra en el sentido. Es obvio que las secuencias antisentido así obtenidas tienen que complementarse mediante el emparejamiento de bases para así formar al menos parcialmente la estructura de hebra doble necesaria para un siARN funcionalmente activo.

En base al modo de acción de las clases de compuestos mencionados anteriormente, tales como anticuerpos, péptidos, anticalinas, aptómeros, spiegelmeros, ribozimas, oligonucleótidos antisentido además de siARN, está también así dentro de la presente invención el usar cualquiera de estos compuestos que desactivan la proteína quinasa N beta y el ácido nucleico que la codifica por lo tanto, respectivamente, para la fabricación de un medicamento o un agente diagnóstico para cualquiera de las enfermedades como se describen en este documento o cualquiera de los procesos enfermos descritos en este documento. Además, estos agentes pueden usarse para monitorizar la progresión de dichas enfermedades o procesos enfermos y el éxito de cualquier terapia aplicada, respectivamente.

Las diversas clases de compuestos diseñados según la presente invención tales como anticuerpos, péptidos, anticalinas, moléculas pequeñas, aptómeros, spiegelmeros, ribozimas, oligonucleótidos antisentido y siARN, pueden estar contenidos también en una composición farmacéutica. Preferiblemente dicha composición farmacéutica se usa para el tratamiento de las enfermedades como se describe en este documento o los procesos enfermos descritos en este documento. La composición farmacéutica puede comprender en una realización una o varias de las clases de compuestos mencionadas anteriormente y/o uno o más miembros de una única clase, y opcionalmente un compuesto farmacéutico activo adicional y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo puede ser o bien líquido o sólido, por ejemplo una disolución, un tampón, una disolución alcohólica o similares. Vehículos sólidos adecuados son, entre otros, almidón y similares. Es conocido por un experto en la técnica el proporcionar formulaciones respectivas para los diversos compuestos según las clases de compuestos mencionadas anteriormente para realizar la ruta particular de administraciones tal como oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular y similares.

Los diversos compuestos de las diferentes clases de compuestos como se mencionan anteriormente, pueden estar también, o bien solos o en combinación, sometidos a o contenidos en un equipo. Dicho equipo comprende aparte del (de los) respectivo(s) compuesto(s), adicionalmente uno o varios elementos o compuestos adicionales por lo cual los

5 elementos se seleccionan del grupo que comprende tampones, controles negativos, controles positivos e instrucciones en el uso de los diversos compuestos. Preferiblemente, los diversos compuestos están presentes en forma o bien seca o líquida, preferiblemente como una dosificación unitaria para una única administración cada una. El equipo puede usarse particularmente para la terapia, diagnosis o monitorización del progreso de la enfermedad o pueden aplicarse terapias en relación a las enfermedades y procesos enfermos como se describe en este documento.

10 La presente invención se ilustra ahora adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos que no pretenden limitar el alcance de protección. A partir de dichas figuras y ejemplos pueden tomarse características, realizaciones y ventajas adicionales, en los que

10 La Fig. 1 muestra una representación esquemática de la activación inducida por el factor de crecimiento de la ruta de la PI 3-quinasa;

15 La Fig. 2 muestra la medida de la metástasis del nodo linfático en un modelo de ratón PC-3 ortotópico después del tratamiento con rapamicina;

20 La Fig. 3 muestra la propuesta experimental para identificar la PKNbeta como una diana de fármaco posterior de la ruta de la PI3-quinasa;

20 La Fig. 4 muestra una criba GeneBloc primaria en la PKNbeta;

La Fig. 5 muestra el crecimiento de las células PC3 transfectadas con GB específico de PKNbeta en matrigel;

25 La Fig. 6 muestra la interferencia de ARN por la expresión transitoria de siARN en células HeLaB;

25 La Fig. 7 muestra fotografías de células de próstata humana y células cancerosas de próstata humana en hibridación usando secuencias antisentido y en el sentido de proteína quinasa N beta como sondas;

30 La Fig. 8 muestra un diagrama que representa el volumen de tumores primarios en un modelo de tumor de próstata ortotópico usando dos construcciones diferentes de siARN (Fig. 8A), un diagrama que representa el volumen de metástasis del nodo linfático en un modelo de tumor de próstata ortotópico usando dos construcciones diferentes de siARN (Fig. 8B), y fotografías de próstata y nodos linfáticos en un modelo de tumor de próstata ortotópico usando siARN de control (Fig. 8C1) y una construcción siARN específica de proteína quinasa N beta (Fig. 8C2);

35 La Fig. 9 muestra un análisis Western-blot de diferentes derivados de proteína quinasa N beta y sus actividades usando MPB como un sustrato de fosforilación estándar en la sobre-expresión transitoria en células HeLa y anticuerpo de anti-proteína quinasa N beta (anti-PK) para detectar los niveles relativos de expresión de los derivados de la quinasa (Fig. 9A), un análisis de Western-blot adicional de diferentes derivados de proteína quinasa N beta usando un anticuerpo específico para la forma fosforilada de la proteína quinasa N beta (Fig. 9B), y una representación esquemática de los diversos derivados de la proteína quinasa N beta usada (Fig. 9C);

40 La Fig. 10 muestra un Western blot de diversos derivados de proteína quinasa N beta (Fig. 10A) para monitorizar los niveles de expresión de los mismos en células HeLa y un análisis en gel de la fosforilación de los derivados de proteína quinasa N beta (Fig. 10B);

45 La Fig. 11 muestra los resultados de los ensayos de inmunoprecipitación para detectar la fosforilación de sustratos de proteína para la proteína quinasa N beta que detecta la forma fosforilada de la misma por Western blot (Fig. 11A) o la incorporación de fosfato marcado con <sup>32</sup>P por auto-radiografía (Fig. 11B). Para asegurar que cantidades comparables de PKNbeta estuvieran presentes en los respectivos precipitados inmunes, el filtro mostrado en la Fig. 11A se volvió a sondear usando un anticuerpo anti-PKNbeta ("quinasa", Fig. 11C).

50 La Fig. 12 muestra un análisis Western Blot que compara la expresión de proteína quinasa N beta endógena en muestras que se trataron con LY294002 para tiempos diferentes en células HeLa y PC-3. El nivel de AKT fosforilado se monitorizó en paralelo para confirmar la eficacia del inhibidor de PI 3-quinasa.

55 La Fig. 13 muestra las cantidades relativas de proteína y actividades quinasa de diversos derivados recombinantes de PKNbeta presentes en inmuno-complejos. Las células que expresan las respectivas proteínas recombinantes se habían tratado con el inhibidor de PI 3-quinasa LY294002 antes de la lisis durante los tiempos indicados.

60 La Fig. 14 muestra un penal de dibujos, por el cual la distribución celular de PKN beta y derivados de la misma tal como PKNbeta natural (Fig. 14A), derivado TA de PKN beta (Fig. 14B), derivado KE de PKN beta (Fig. 14C) y deltaN de PKN beta (Fig. 14D) se investigó por microscopia de fluorescencia confocal. Los derivados recombinantes etiquetados con HA de PKNbeta se expresaron de forma transitoria en células HeLa durante 48 h. Después de la fijación y la permeabilización, se detectó la expresión de las proteínas recombinantes usando un anticuerpo anti-HA seguido por un anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC. Las células se tiñeron marcando la actina citoesquelética con rodamina-faloïdina.

## ES 2 319 894 T3

La Fig. 1 muestra una representación esquemática de la activación inducida por el factor de crecimiento de la ruta de la PI 3-quinasa. La estimulación del factor de crecimiento de las células lleva a la activación de sus receptores cognatos en la membrana celular, que sucesivamente se asocian con y activan las moléculas de señalización intracelular tal como PI 3-quinasa. El supresor tumoral PTEN interfiere con las respuestas posteriores mediadas por PI 3-quinasa y asegura que la activación de la ruta se de de una manera transitoria. LY294002 es un inhibidor de molécula pequeña de la PI3-quinasa. Uno de los genes posteriores conocidos de la PI3-K es mTOR (diana de Rapamicina en mamíferos) que puede inhibirse por el fármaco clínicamente aprobado, rapamicina (Rapamune). La PI 3-K está implicada en la regulación de la proliferación celular, supervivencia celular, transporte de glucosa, translación, metástasis y migración. X están indicando efectores posteriores que representan dianas de fármaco potenciales que se prevé que estén implicadas en la promoción del comportamiento metastático de las células cancerosas. Esta clase de moléculas efectoras que actúan más posteriores en la ruta, es probable que representen mejores dianas de fármaco que dianas más “anteriores” tal como mTOR, ya que tienen menos efectos pleyotrópicos.

El tema de la Fig. 2 a la Fig. 5 se trata en más detalle en conexión con los siguientes ejemplos.

La Fig. 6 muestra la interferencia por expresión transitoria de siARN en células HeLaB.

(A) Las moléculas siARN se generaron por una expresión conducida por un promotor (U6+2) de secuencias específicas diana (patrón derivado de un gen de interés que contiene unas secuencias complementarias del mismo sentido e inverso de 21-meros unidos por un segmento poli A de 12-meros. En la transcripción, los ARN es probable que formen moléculas siARN de doble hebra.

(B) Secuencias patrón de genes desactivados para la expresión de siARN. Se introdujeron secuencias correspondientes en los vectores de expresión que portaba el módulo del promotor U6+2.

(C) Efecto de la expresión de siARN en el crecimiento y la proliferación celular. Las construcciones (véase anteriormente) se expresaron de forma transitoria por transfección en las células HeLaB para experimentos de interferencia de ARNi. Las células se cosecharon 48 horas después de transfectarse y posteriormente se sembraron (80000 células por pocillo) en gel “matrigel”. El efecto de la interferencia de ARN en la expresión de los genes correspondientes se analizó por ensayo de las células transfectadas para crecimiento/proliferación en matrigel. La expresión de siARN dirigido a PTEN no tuvo efecto en el crecimiento celular HeLaB en matrigel (panel derecho), mientras la expresión de siARN específico a p110beta y PKNbeta alteró bruscamente el comportamiento del crecimiento de HeLaB en matrigel (paneles central y derecho).

### Ejemplo 1

#### *Materiales y Métodos*

##### *Cultivo celular*

Se obtuvieron células PC-3 de carcinoma de próstata humano de la Colección de Cultivos Tipo Americanos (ATTC). Las células se cultivaron en Mezcla Nutriente F12K (modificación de Kaighn) que contenía suero de ternera fetal al 10% (CS), gentamicina (50 µg/ml) y anfotericina (50 ng/ml). Se llevaron a cabo transfecciones en placas de 96 pocillos o 10 cm (confluencia de 30% a 50%) usando diversos lípidos catiónicos tales como Oligofectamina, Lipofectamina (Life Technologies), Argfectin50 o Profectin50 (Atugen/GOT Berlín, Alemania), o FuGene 6 (Roche) según las instrucciones del fabricante. Se transfectaron GeneBlocs añadiendo complejo concentrado 5x pre-formado de GeneBloc y lípido en medio libre de suero a células en medio completo. El volumen total de transfección fue 100 µl para células colocadas en placas en 96 pocillos y 10 ml para células en placas de 10 cm. La concentración final de lípidos fue 0,8 a 1,2 µg/ml dependiendo de la densidad celular; la concentración de GeneBloc se indica en cada experimento.

Las células cultivadas se tripsinaron y cosecharon después de parar el efecto de la tripsina por el medio. Se añaden procedimientos de lavado (PBS; centrifugado 5 min/1.000 rpm) y finalmente, la bolita se vuelve a suspender considerando el número celular y el volumen a inocular.

##### *Determinación de las cantidades relativas de niveles de ARN por análisis Taqman*

El ARN de las células transfectadas en 96 pocillos se aisló y se purificó usando el equipo Invisorb RNA HTS 96 (InVitek GmbH, Berlín). La inhibición de la expresión de mARN de PKN beta se detectó por análisis RT-PCR a tiempo real (Taiman) usando cebador PKNbeta 5' 300 nM, cebador PKNbeta 3' 300 nM y 100 nM de la sonda Taqman de PKNbeta marcada con Fam-Tamra. La reacción se llevó a cabo en 50 µl y se ensayó en el detector de secuencia ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante bajo las siguientes condiciones: 48°C durante 30 min, 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 seg. a 95°C y 1 min a 60°C.

##### *Crecimiento in vitro en matriz de matrigel*

Las células PC3 se trataron con LY294002 o DMSO 5 µM cuando se sembraron en matrigel. Si las células se transfectaron antes de sembrar, las células se transfectaron con GeneBloc y se tripsinizaron 48 h después de la trans-

## ES 2 319 894 T3

fección. Las células se lavaron en el medio se sembraron en 24 pocillos duplicados (100.000 células por pocillo) pre-recubiertas con matriz de membrana base de matrigel 250 1 (Becton Dickinson). Después de la incubación durante 24 a 72 h, se tomaron fotografías con una ampliación 5x con una cámara AxioCam unida a un microscopio Axiovert S100 (Zeiss).

### Affymetrix

El ARN total de las células que se hicieron crecer en matrigel se preparó usando el equipo Totally RNA (AMBION) siguiendo el protocolo de los fabricantes. En la etapa final el ARN total precipitado se volvió a suspender en tampón de lisis Invisorb y se purificó usando el equipo de giro célula-ARN Invisorb (INVITEK). Se preparó cARN marcado con biotina siguiendo los protocolos Affymetrix y se hibridaron 15  $\mu$ g de cARN en el equipo Affymetrix GeneChip HG-U95.

### Análisis de datos

Los datos en bruto se analizaron usando el software Microarray Suite v4.0 de Affymetrix GeneChip. La intensidad de cada conjunto de sondas se calcula como la diferencia de la señal de hibridación de oligonucleótidos de emparejamiento perfecto en comparación con oligonucleótidos desemparejados promediados sobre el conjunto de 16 a 20 pares de sondas correspondientes a una transcripción. La diferencia promedio de un conjunto de sondas es proporcional a la abundancia de una transcripción. Las intensidades totales de la señal de diferentes series se subieron al mismo valor antes de la comparación. Se calcularon los cambios por desdoblamiento usando el software de Affymetrix por comparación de pares de las intensidades de pares de sondas correspondientes a partir de las series del experimento y la línea base. Usando matrices de decisión descritas por Affymetrix, el software también generó llamadas absolutas (la transcripción está ausente, marginal o presente en un experimento) y diferencias de llamadas (abundancia de una transcripción en un experimento en comparación con otro: aumento, aumento marginal, sin cambio, disminución marginal, disminución). Los resultados se exportaron a Microsoft Excel (llamada absoluta, llamada de diferencia, cambio por desdoblamiento) y se filtraron. Todos los conjuntos de sondas con llamadas ausentes o una llamada sin cambio se descargaron y la tabla se clasificó por el cambio por desdoblamiento.

### Estudios en animales

Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo correspondiendo a la Práctica del Buen Laboratorio para los Estudios de Laboratorio no Clínicos (Regulaciones GLP) de la Food and Drug Administration y de acuerdo con la ley alemana de protección animal como base legal.

Ratones macho shoe:NMRI-nu/nu (Tierzucht Schönwalde GmbH) mantenidos en condiciones SPF (equipo de flujo de aire laminar, Scantainer, Scanbur) sirvieron como recipientes para las células de carcinoma de próstata humana. Los animales, de 6 a 8 semanas de edad y pesando 28 a 30 g, se inocularon con  $2 \times 10^6 / 0,03$  ml de células tumorales tanto en el lóbulo dorsolateral izquierdo de la glándula prostática (iprost; Ortotópica) como en la punta del lóbulo lateral izquierdo del hígado (ihep; Ectópica). Para este propósito, los ratones recibieron una anestesia corporal total usando una mezcla de Ketanest (Parke-Davis GmbH) y Rompun (Bayer Vital GmbH) 80:10 con dosificaciones de 100 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente. Después de la rigurosa esterilización de la superficie del cuerpo ventral, se llevó a cabo una incisión a través de la piel abdominal y la pared peritoneal empezando cerca del borde de la glándula prepucial y midiendo aproximadamente 1 cm. Por medio de un par de pinzas y una compresa de algodón, se visualizó la glándula prostática. Los cambios de células ortotópicas se continuaron con la ayuda de un cristal de ampliación y mediante el uso de una jeringa de 1 ml (Henke Sass Wolf GmbH) que portaba agujas 30G de microlanza de 0,30x13 (Becton Dickinson). Una administración tuvo éxito observando una ampolla marcada en el sitio de inoculación. La herida se cerró mediante material de sutura (PGA Resorba, Franz Hiltner GmbH) afectando a la pared peritoneal y con mordazas Michel de 11x2 mm (Heiland) para la piel abdominal. Un pulverizador de heridas (Hansaplast Sprühpflaster, Belersdorf AG) cubrió la lesión. Durante la fase post-quirúrgica, los animales se mantuvieron en un medio caliente hasta el completo despertar. Los animales se distribuyeron al azar según el número de grupos de tratamiento que consistían en 5 a 10 animales por cada grupo. Se inspeccionaron sucesivamente incluido la protocolización de los descubrimientos. Se administra Ssniff NM-Z, 10 mm, esterilizable en autoclave (ssniff Spezialdiäten GmbH) como dieta fortalecida y el agua de beber se acidula por HCl, ambos *ad libitum*.

### Evaluaciones

Para recibir el nivel de dosificación real, se registraron los pesos corporales en los días de tratamiento. Al mismo tiempo, puede derivarse del desarrollo del peso corporal para reconocer las influencias de las modalidades de tratamiento en el organismo completo.

Se llevaron a cabo punciones para sacar sangre el día 0 (línea de base); 14; 28 y 35 (sacrificio). La sangre se extrajo de la vena orbital de animal anestesiado a corto plazo (Dietiléter, Otto Fischar GmbH). Los parámetros de evaluación que dan datos para la compatibilidad y efectos secundarios de los tratamientos son los siguientes: números de leucocitos; números de trombocitos; enzimas. Parámetros adicionales soportados por la sangre fueron bilirrubina, creatinina, proteína, urea, ácido úrico.

## ES 2 319 894 T3

Todos los animales sacrificados se diseccionaron completamente y se documentaron fotográficamente. Los tumores (glándula prostática) y metástasis (metástasis del nódulo linfático caudal, lumbar y renal) se midieron en dos dimensiones por medio de un par de calibradores. El volumen se calculó según  $V \text{ (mm}^3\text{)} = ab^2/2$  con  $b < a$ . En general, el número de células llevadas a cabo para la propuesta de terapia provoca un 100% de generación de tumor en lo que respecta a la glándula prostática. Los pesos de algunos órganos (hígado, bazo, riñón) se registraron para encontrar datos adicionales que afecten al conocimiento sobre efectos secundarios.

Para análisis histológicos, las muestras de tejidos tumorales, es decir, tumor de próstata y metástasis de nodo linfático, se fijaron en formaldehído al 5% y se incrustaron en parafina. De forma rutinaria, las secciones se tiñeron con HE, y se hicieron tintados específicos si fuera necesario (Azan, PAS).

Para detectar el origen humano de las células tumorales y metastáticas, se congelaron muestras adecuadas de tejido en nitrógeno líquido. Cuando se usa análisis PCR y Taqman con amplímero específico huHPRT, se podrían detectar 50 células humanas en 5 mg de tejido.

Los resultados terapéuticos se verificaron estadísticamente mediante el ensayo u de Mann y Whitney.

### Ejemplo 2

#### *Prueba de concepto experimental en la idoneidad de dianas de fármaco posteriores*

Como se esboza en la parte introductoria de esta memoria que se incorpora en este documento por referencia, las dianas unidas posteriormente a una ruta de señalización son valiosas para el diseño o desarrollo tanto de medicamentos como de agentes diagnósticos. Es obvio que, si la diana particular está unida a otras rutas diferentes o debido a su posición dentro de la ruta de señalización se une a un número de fenómenos biológicos tales como, por ejemplo, metástasis y migración, traslación de crecimiento, apoptosis, ciclo celular, reparación de ADN y similares como en el caso de la PI-3 quinasa, cualquier compuesto que se dirige a esta diana es probable que tenga un número de efectos secundarios que pueden ir en detrimento del sistema y ser indeseados desde el punto de vista médico. Por consiguiente, las dianas que actúan más abajo serían la primera opción para la intervención terapéutica.

Los presentes inventores han encontrado que bajo el control de la ruta de la PI 3-quinasa, están implicadas más dianas de fármaco posibles aparte del mTOR, que son específicas para controlar los fenómenos de metástasis y migración y así, de tumorigénesis. En la industria farmacéutica se ha encontrado que la rapamicina, vendida bajo la marca registrada de Rapamune, es adecuada para inhibir la metástasis y la migración. Esto confirma la idoneidad de la estrategia para dirigirse a dianas de fármaco posteriores.

Como puede tomarse de la Fig. 2, la rapamicina es adecuada para reducir el volumen de metástasis del nodo linfático y es comparable en lo que es posible en su efecto al bien conocido inhibidor de PI 3-quinasa, LY294002. Como se representa en la Fig. 2A, se usó el modelo de exposición al tumor y el tratamiento empezó con Rapamune el día 1. Ambas concentraciones usadas, es decir 0,4 mg/kg/dosis -2 mg/kg/dosis, llevaron a una tremenda disminución de la extensión de metástasis del nodo linfático, expresada como volumen medido de metástasis ( $\text{mm}^3$ ) en comparación con el control negativo que era disolución salina tamponada con fosfato.

Para análisis histológicos, muestras de tejidos tumorales, es decir, tumor de próstata y metástasis de nodo linfático, se fijaron en formaldehído al 5% y se incrustaron en parafina. De forma rutinaria, las secciones se tintaron con HE, y se hicieron tinturas específicas si fuera necesario (Azan, PAS).

Los mismos resultados también se obtuvieron básicamente en el caso de tratamiento con Rapamune de un modelo tumoral establecido empezando con el tratamiento el día 28.

Se midió la metástasis del nodo linfático en un modelo de ratón PC-3 ortotópico después del tratamiento con rapamicina (Rapamune). En la Fig. 2(A), se muestran los resultados de (A), modelo de exposición al tumor. Ratonos desnudos Shoe:NMRI-nu/nu (8 por grupo) se inyectaron con  $2 \times 10^6$  células PC3 en 0,03 ml de forma intraprostática y se llevó a cabo el tratamiento usando Rapamune de forma intraperitoneal diariamente durante 28 días a dosis de 2 mg/kg y 0,4 mg/kg. El PBS sirvió como control.

Para el tratamiento de tumores establecidos (B), se dejó crecer a las células ipros durante 28 días y se llevó a cabo el tratamiento de forma oral usando Rapamune en los días 29 a 50 después de la implantación. Las dosis se eligieron como se esboza en A. Los animales se sacrificaron en los días 29 y 51, respectivamente, y se determinó la metástasis total del nodo linfático.

## ES 2 319 894 T3

### Ejemplo 3

#### *Identificación de PKN beta como diana de fármaco posterior dentro de la ruta de la PI 3-quinasa*

5 La propuesta básica experimental se muestra en la Fig. 3. Las células PC3 crecidas en Matrigel se trataron o bien con DMSO o con el inhibidor de PI 3-K, LY294002, y el ARN total se aisló de cada muestra. Se realizó un perfil de expresión génica Affymetrix diferencial y la expresión se confirmó usando el ensayo RT-PCR Taqman a tiempo real. Se usó p110 como un patrón no diferencial. Las células PC3 son PTEN -/- lo que significa que el supresor tumoral PTEN está faltando objetivamente en estas células, por lo que la ruta de la PI 3-quinasa está permanentemente activa, lo que lleva a una actividad o comportamiento metastático aumentado de las células que se expresa por su patrón de crecimiento en el ensayo en matrigel. Las células con potencial de crecimiento invasivo muestran crecimiento aumentado en la membrana basal tal como la matriz de matrigel. (Petersen, O.W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A.R. y Bissell, M.J. (1992) Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 9064-9068. (Auch: Sternberger *et al.*, 2002 Antisense & Nucleic acid drug development 12:131-143)

En conexión con esto, se va a anotar que las células PC3 se hicieron crecer en matrigel y lo tomaron como un sistema modelo que está cerca del medioambiente *in vivo*. El ARN aislado del mismo se asume que está más cerca de la situación o resultados *in situ* que cualquier preparado obtenido de células hechas crecer en un medioambiente que no es matrigel tal como una placa de cultivo celular convencional.

### Ejemplo 4

#### *Cribado para oligonucleótidos antisentido óptimos dirigidos a proteína quinasa N beta*

Las células PC3 se transfectaron con diferentes concentraciones de GeneBloc como se describe, y se determinaron los niveles de mRNA 24 horas después de la transfección usando ensayos Taqman con 300 nM de cebador directo e inverso específico de PKNbeta y 100 nM de sonda y 40 nM de cebador directo e inverso y 100 nM de sonda para la actina humana. Los niveles de mRNA se estandarizaron para niveles internos de actina y se muestran las cantidades respecto a GBC (células transfectadas con un Control GeneBloc).

El resultado del mismo se muestra en la Fig. 4. A partir de la Fig. 4 se seleccionaron GeneBlocs 70210 y 70211 como oligonucleótidos antisentido particularmente ventajosos para estudios adicionales.

En conexión con el GeneBloc como se usa en este documento en los diversos ejemplos, se va a anotar que son todos oligonucleótidos antisentido de tercera generación como se especifica en este documento, lo que significa, como también es obvio por la tabla 1, que las letras del caso superior representan los desoxirribonucleótidos que se unieron a través de un fosforotioato más que una unión fosfodiéster.

TABLA 1

*Visión general de los diversos GeneBlocs usados, sus alias, desapareamientos respecto al ácido nucleico diana y sus secuencias y características estructuradas*

GeneBloc núm.	Alias	MM	Secuencia
70669	PKNbeta:706L21	0	ggagguCCAGTTTCTgagagg
70670	PKNbeta:377L21	0	uguuucACCTTCAGCuccaca
24536	PKNbeta:2021L23	0	aggacaaCACAAGCCAcgtagaa
24537	PKNbeta:2665L23	0	gctctgaCACAAAGTCgaagtcc
24538	PKNbeta:2322L23	0	gcagtcaAACACCTCTtcctctg
70210	PKNbeta:1034L21	0	caacacGGTTGTCCAccttta
70211	PKNbeta:1784L21	0	tcagtgCTTTGATGGcgtagt
70671	PKNbeta:183L21	0	cuucucGCAGTACAGgcucuc
70676	PKNbeta:1034L21	4	caagacGCTTGTGCAGcttta
70677	PKNbeta:1784L21	4	tcagagCTTAGTTGGcgttgt

## ES 2 319 894 T3

Los diversos GeneBlocs corresponden a los siguientes SEQ ID NO.:

	70669:	SEQ ID NO. 3
5	70670:	SEQ ID NO. 4
	24536:	SEQ ID NO. 5
	24537:	SEQ ID NO. 6
10	24538:	SEQ ID NO. 7
	70210:	SEQ ID NO. 8
15	70211:	SEQ ID NO. 9
	70671:	SEQ ID NO. 10
	70676:	SEQ ID NO. 11
20	70677:	SEQ ID NO. 12

Además se va a anotar que cualquiera de las “t” anteriores son de hecho “u” dando el hecho de que los oligonucleótidos antisentido anteriores son GeneBlocs, es decir, oligonucleótidos antisentido de tercera generación.

### 25 Ejemplo 5

#### *Paralización selectiva de la proteína quinasa N beta*

30 Para probar que la proteína quinasa N beta es una diana de fármaco posterior adecuada de la ruta de la PI 3-quinasa, se usaron los dos GeneBlocs particularmente ventajosos como se obtienen del ejemplo 4 en un experimento de crecimiento basado en matrigel. El experimento de crecimiento en matrigel se toma como un modelo sustituto que muestra el comportamiento de metástasis y migración de la respectiva célula. Un crecimiento más confluyente de las células se toma como una indicación de que su comportamiento de metástasis y migración se aumenta, lo que permite a las células propagarse sobre la estructura tridimensional proporcionada por el matrigel.

35 Las células PC3 se transfectaron y sembraron en matrigel como se describe y se monitorizó el crecimiento. El mARN se aisló a partir de una alícuota de las células sembradas en matrigel y se analizó usando el ensayo Taqman (panel izquierdo). El mARN específico de PKNbeta se estandarizó a niveles de mARN p110a endógeno. Se usa un GeneBloc específico de PTEN como un control negativo en las células PC-3 PTEN -/- y se usa un GeneBloc específico de p110 $\alpha$  como un control positivo para el crecimiento en la matriz extracelular. La inhibición específica del crecimiento se muestra comparando el crecimiento de las células tratadas con GeneBloc específico de PKN beta 70210 o 70211 frente a sus oligonucleótidos desapareados correspondientes 70676 y 70677, respectivamente.

45 Los respectivos resultados también se ilustran en la Fig. 5. A partir de esto, puede aceptarse que los GeneBloc 70211 y 70210 pueden ser compuestos adecuados para la fabricación de un medicamento o agente diagnóstico para el tratamiento de enfermedades y procesos enfermos como se describe en este documento.

### 50 Ejemplo 6

#### *Interferencia de ARN por expresión transitoria de siARN en células HeLaB*

55 Este experimento es un ejemplo en el diseño exitoso de siARN que permite que se dirija de forma específica la proteína quinasa N beta diana de fármaco posterior. Como se ilustra en la Fig. 6 (A), las moléculas siARN se generaron por expresión conducida por el promotor (U6+2) de secuencias diana específicas (patrón derivado del gen de interés que contiene unas secuencias complementarias en el sentido e inverso de 21-meros unido por un segmento poli A de 12-meros. En la transcripción, los ARN es probable que formen moléculas siARN de hebra doble.

60 Las diversas construcciones tal como p110beta y PTEN se usaron como control positivo y negativo, respectivamente en la misma construcción de vector como el siARN diseñado frente a la secuencia mARN de la PKNbeta. El respectivo diseño se muestra en la Fig. 6 (B) donde las secuencias patrón de genes dirigidos para la expresión de siARN se introdujeron en los vectores de expresión que portan el módulo del promotor U6+2.

65 Las construcciones se expresaron transitoriamente por transfección en células HeLaB para experimentos de interferencia de ARNi. Las células se cosecharon 48 horas después de transfectarse y posteriormente se sembraron (80000 células por pocillo) en matrigel. El efecto de la interferencia del ARN en la expresión de los correspondientes genes se analizó mediante ensayo de células transfectadas por crecimiento/proliferación en matrigel. La expresión de siARN

dirigido a PTEN no tuvo efecto en el crecimiento en matrigel de las células HeLaB (panel derecho), mientras la expresión de siARN específico a p110beta y PKNbeta perturbó severamente el comportamiento del crecimiento de HeLaB en matrigel (paneles del medio y derecho).

5 En vista de esto, la secuencia particular de siARN prueba que es un medio eficaz para el tratamiento de la enfermedad y los procesos enfermos como se describe en este documento.

#### Ejemplo 7

##### 10 *Detección de proteína quinasa N beta en tumor de próstata humano*

Para dar evidencia adicional de que la proteína quinasa N beta es una diana adecuada en el tratamiento del tumor de próstata, se sometió el respectivo tejido de próstata humana a una hibridación *in situ*.

15 Para la hibridación *in situ* se prepararon hebras tanto en el sentido como antisentido para las posiciones de nucleótido 1672 a 2667 a partir de la secuencia NM 013355 en el vector pCR4 Topo, con lo cual se usó polimerasa T7 y T3 para propósitos de amplificación. Las células de tumor de próstata humano (PC-3) se hicieron crecer en ratones. Después de la disección, el tejido se congeló a -20°C en disolución de isopentano, se cortaron rodajas a -15°C y se almacenaron a -80°C. Antes de la hibridación las rodajas se fijaron en paraformaldehído. El espécimen de tumor humano se fijó en paraformaldehído y se incrustó en parafina. Los especímenes tumorales se trataron con proteinasa K y se acetilaron. Las sondas de ácido nucleico se marcaron de forma doble con <sup>35</sup>S-ATP y <sup>35</sup>S-UTP y se incubaron con tejidos a 58°C en un tampón de hibridación (NaCl 0,4 M, formamida al 50%, 1x de Denhardt, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, sulfato de dextrano al 10%, 10 µg/ml de cada tARN y ADN de esperma de salmón, DTT 10 mM) que contenía formamida al 50%.

20 El resultado de la hibridación *in situ* se representa en la Fig. 7. Usando una sonda antisentido de proteína quinasa N beta para la hibridación *in situ* de tumor de próstata, las glándulas se tiñeron de forma intensiva (Fig. 7A). En contraste con esto, el tejido de próstata sano está menos teñido y proporciona solo una señal de fondo, usando de nuevo la sonda antisentido (Fig. 7C). En contraste con esto, el uso de la sonda en el sentido en conexión con ambos tejidos, no proporciona ninguna señal.

#### Ejemplo 8

##### 35 *Reducción *in vivo* de tumor primario y metástasis del nodo linfático por siARN*

Este ejemplo está relacionado con la validación del gen diana *in vivo* usando un modelo tumoral de próstata ortotópico en que podría mostrarse que usando siARN dirigido por proteína quinasa N beta, podría realizarse una reducción tanto del tumor primario como de la metástasis del nodo linfático. Los resultados se representan en las Figs. 8A a 8C.

40 En el diagrama de la Fig. 8A, el volumen de los tumores primarios, determinado como se describe en el ejemplo 1, en un modelo tumoral de próstata ortotópico podría reducirse significativamente usando cualquiera de las dos siguientes construcciones de siARN:

5' actgagcaagaggctttggag o

5' aaattccagtgttcattcca.

50 Como control negativo se usó siARN frente a la subunidad p110- $\alpha$ , y como control positivo siARN frente a la subunidad p110- $\beta$ . El control positivo dirige así el regulador anterior de proteína quinasa N beta PTEN.

55 Un conjunto adicional de dos moléculas siARN independientes se usó para degradar el mRNA que codifica la proteína quinasa N beta en las metástasis del nodo linfático. Las metástasis del nodo linfático son tumores secundarios encontrados en los siguientes nodos linfáticos: nodos linfáticos caudal, lumbar, renal y mediastinal, por lo cual los nodos linfáticos caudales son los más cercanos a la próstata y los nodos linfáticos mediastinales son los más distantes al tumor de implantación. Como en el caso del tumor primario, las construcciones siARN fueron reduciendo obviamente de forma exitosa el mRNA que codifica la proteína quinasa N beta y reduciendo así el volumen tumoral (Fig. 8B). Los controles positivo y negativo fueron como se trata en conexión con la reducción del tumor primario. En ambos casos, es decir, para el tumor primario y la metástasis del nodo linfático, las células del tumor de próstata humano se manipularon genéticamente para expresar las respectivas moléculas siARN a partir del promotor III U6 de polimerasa.

65 Aparte de estos resultados, un claro análisis fenotípico como se representa en la Fig. 8C1 y Fig. 8C2 muestra que en la activación de la transcripción de la construcción siARN en las células del tumor de próstata humano, la metástasis del nodo linfático podría reducirse significativamente y el nodo linfático hinchado representado en la Fig. 8C1 no está presente en el tejido tratado con siARN como se representa en la Fig. 8C2.

Ejemplo 9

*Caracterización funcional de la proteína quinasa N beta*

5 Este ejemplo está relacionado con la caracterización funcional de la proteína quinasa N beta y más particularmente con el impacto de derivación, es decir, truncamiento o mutación de residuos de aminoácido funcionales, de proteína quinasa N beta en su actividad quinasa y en la regulación de su actividad quinasa por fosforilación.

10 Los siguientes derivados de proteína quinasa N beta se generaron como también se representan al menos parcialmente de forma esquemática en la Fig. 9C con los residuos de aminoácido que se refieren a la secuencia natural como se describe en este documento:

- a) Dominio quinasa que comprende los aminoácidos 535-889;
- 15 b) ΔN que comprende los aminoácidos 288-889;
- c) Dominio quinasa que tiene una mutación en la posición 588 de lisina a arginina;
- d) Dominio quinasa que tiene una mutación en la posición 588 de lisina a ácido glutámico;
- 20 e) Derivados del dominio quinasa que tienen mutaciones en el sitio de fosforilación (consenso del bucle de activación AGC) con el residuo de treonina en la posición de aminoácido 718 cambiándose o bien por alanina (TA718) o por ácido aspártico o ácido glutámico (TD718 o TE718); y
- 25 f) Longitud total de la molécula PKNbeta natural (889 aminoácidos).

Los respectivos fragmentos se expresaron de forma transitoria en las células HeLa. Su expresión relativa se determinó por análisis Western-blot de extractos celulares HeLa usando un anticuerpo anti-PKNbeta.

30 El antisuero anti-PKNbeta policlonal se generó después de la sobre-expresión de aminoácidos C-terminales (609-889) de PKNbeta en *E. coli*. El respectivo fragmento de proteína se purificó en gel a partir de cuerpos de inclusión, se recuperó y se concentró según los procedimientos estándar.

35 La proteína quinasa N beta tiene homologías con las moléculas quinasa tipo AGC en su dominio catalítico en el extremo C. La familia de quinasas se caracteriza por un residuo conservado de treonina en el bucle de activación del dominio catalítico que necesita fosforilarse para la actividad enzimática. Debido a la alta conservación de esta treonina y el contexto circundante de aminoácidos en el bucle de activación, los anticuerpos anti-fosfo contra este sitio están disponibles a partir de fuentes comerciales. A los respectivos anticuerpos se los denominan como anti-P\*-PRK en la Fig. 9 y anti-P\*-AGC quinasa en la Fig. 10. MPB es la proteína básica de mielina que es un sustrato de fosforilación *in vitro* estándar.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Derivado de proteína quinasa N beta	Actividad
Peso de longitud total	+++
Dominio quinasa que comprende los aminoácidos 535-889	+*
40 ΔN que comprende los aminoácidos 288-889	-*
Dominio quinasa que tiene una mutación en la posición 588 de lisina a arginina (KR 588)	-*
55 Dominio quinasa que tiene una mutación en la posición 588 de lisina a ácido glutámico (KE 588)	-*
TA718	-*
60 TD718 o TE718	-*!
*+: activo -: inactivo !: no se observó "hiperactivación" como se habría esperado por mutaciones comparables en otras quinasas (Morgan y Debond, 1994)	

Los resultados se representan en la Fig. 9.

La Fig. 9A muestra un análisis en gel de diferentes derivados de proteína quinasa N beta y sus actividades usando MPB como un sustrato de fosforilación estándar en la sobre-expresión transitoria en células HeLa. Como puede tomarse de la Fig. 9A, aparte de la proteína quinasa N beta de longitud total solo el dominio quinasa en su otra forma natural está activa en MPB de fosforilación.

Usando los mismos derivados de proteína quinasa N beta puede observarse que excepto el derivado que comprende el dominio quinasa que tiene la mutación T/A en la posición 718, todos los demás derivados mostrados se fosforilaron también a pesar de sus actividades intrínsecas adicionales.

El dato indica que la presencia de un dominio quinasa funcional y la fosforilación en la posición 718 son pre-requisitos para la actividad quinasa PKNbeta. Sin embargo, como puede concluirse por la incapacidad de la versión ΔN de actuar como una quinasa, no son suficientes. El dato también indica que la PKNbeta no autofosforila en el aminoácido 718, aunque en vez de eso, necesita fosforilación por otra molécula quinasa, ya que la proteína mutante KR588 defectuosa en quinasa retiene la fosforilación en la posición 718.

#### Ejemplo 10

##### *Caracterización de la PKNbeta de longitud total*

Para analizar mutaciones de residuos de aminoácidos funcionales de proteína quinasa N beta en el contexto de la molécula de longitud total, se llevaron a cabo los siguientes experimentos como se muestra en las figuras 10 y 11:

Para medir la actividad quinasa de la PKNbeta *in vitro*, derivados de KPNbeta recombinantes marcados con HA o Myc se expresaron de forma transitoria en células HeLa o COS-7. El derivado con menor dominio quinasa sirvió como un control. Los extractos celulares que contienen las versiones recombinantes de la proteína quinasa N beta se sondaron en paralelo con anticuerpo de anti-proteína quinasa N beta (Fig. 10A) como se describe en el ejemplo 9 para demostrar niveles comparables de expresión, y un anticuerpo del sitio anti-fosfo AGC (también denominado como anti-P\*-AGC-quinasa) (Fig. 10B) para mostrar el diferente grado de fosforilación de los derivados de proteína quinasa N beta *in vivo*.

#### Ejemplo 11

##### *Necesidades de fosforilación para la actividad de la proteína quinasa N beta de longitud total y desarrollo de un ensayo de quinasa in vitro no radiactivo - idoneidad de la proteína quinasa N beta para los ensayos HTS*

Las moléculas derivadas de PKNbeta se inmuno-precipitaron de los extractos celulares mostrados en la Figura 10 usando anticuerpos anti-marcado. Los precipitados inmunes se lavaron como se describe (Klippel *et al.*, 1996) y se dividieron en dos mitades. Una mitad se incubó con 5 μg de MBP (UBI) como un sustrato de fosforilación, MgCl<sub>2</sub> 4 mM y <sup>32</sup>P-ATP gamma en una disolución tamponada durante 10 min a temperatura ambiente. Además, se añadieron inhibidores de fosfatasa e inhibidores contra las quinasas que actúan de forma no específica como en Klippel *et al.*, 1998. Se detectó la incorporación de fosfato radiactivo mediante auto-radiografía después de separar los productos de reacción por SDS-PAGE al 16% (Fig. 11B).

La segunda mitad de los precipitados inmunes se incubó con 1 μg de proteína de fusión GST-GSK3 (Tecnología de Señalización Celular) como un sustrato de fosforilación en presencia de rATP 200 μM. La mezcla de reacción se analizó posteriormente por SDS-PAGE con gradiente de 8-16% y con Western blot usando el anticuerpo anti-fosfo GSK3alfa (Tecnología de Señalización Celular) (Fig. 11A). El filtro se quitó entonces y se re-sonó con antisuero anti-PKNbeta para confirmar la presencia de cantidades comparables de proteínas PKNbeta en los respectivos precipitados inmunes (Fig. 11C).

La especificidad de las reacciones de fosforilación *in vitro* se controló analizando variantes defectuosas en quinasa (por ejemplo, que contienen mutaciones en el sitio de enlace ATP, véase anteriormente) en paralelo a la proteína activa.

La falta de señal en caso de la variante de mutación TA en el aminoácido 718 de la proteína quinasa N beta, que por lo demás es la proteína quinasa N beta natural de longitud total, indica que este residuo de aminoácido es efectivamente la posición de fosforilación detectada por el anticuerpo (Figura 10B). El hecho de que las variantes deficientes en quinasa (mutación KE o KR como se muestran en la Fig. 10 y Fig. 9, respectivamente) se fosforilen en este sitio indica que la treonina 718 no es un sustrato para auto-fosforilación. Más bien otra quinasa en las células debe ser responsable de la fosforilación de este sitio; por lo cual PDK1 es un posible candidato.

Además, a partir de este experimento en combinación con el del ejemplo 9, se revela que la fosforilación de proteína quinasa N beta en la posición 718 es un pre-requisito para la actividad de la proteína quinasa N beta; todas las mutaciones probadas en este sitio evitaban la fosforilación y daban por resultado una molécula quinasa inactiva. A ese grado, una proteína quinasa N beta particularmente preferida que puede usarse en conexión con cualquier aspecto

## ES 2 319 894 T3

de la invención como se describe en este documento es una proteína quinasa N beta que se fosforila en la posición 718 o un derivado de la misma, que incluye el derivado que comprende el dominio quinasa solo como se describe en este documento. El dato indica adicionalmente que además la PKNbeta de longitud total no auto-fosforila en el aminoácido 718, aunque en cambio, necesita la fosforilación de otra molécula quinasa, ya que la proteína mutante KE588 defectuosa en quinasa retiene la fosforilación en la posición 718.

Como puede tomarse de la Fig. 11, ensayar la actividad de la proteína quinasa N beta puede adaptarse en un formato que permite el cribado de los inhibidores de la proteína quinasa N beta en un sistema de alto rendimiento.

En una primera etapa, se determinó la idoneidad de un formato de cribado no radiactivo, por lo cual los diversos derivados de proteína quinasa N beta como ya se han tratado en conexión con el ejemplo 10, se usaron para fosforilar un sustrato adecuado. Dicho sustrato puede ser, por ejemplo, MBP o un péptido GSK3 que se inmoviliza típicamente en un vehículo adecuado tal como gotas de agarosa o sefarosa o en superficies plásticas. En el presente caso y como se representa en la Fig. 11A, el sustrato es un péptido derivado de GSK3 condensado con paramiosina. La primera flecha indica que todos de los diversos ensayos que usan diferentes derivados de proteína quinasa N beta, contienen de hecho dichos derivados. Solo la proteína quinasa N beta natural de longitud total o el dominio quinasa como se define en el ejemplo 9, fueron adecuados para fosforilar el sustrato. El sustrato fosforilado en el presente caso se detectó por anticuerpo anti-fosfo GSK3 alfa (mencionado anteriormente).

Para asegurar que la propuesta no radiactiva como se representa en la Fig. 11A es lo suficiente sensible, la propuesta radiactiva se llevó a cabo en paralelo con la mitad de los precipitados inmunes usando el MBP como un sustrato de fosforilación. La eficacia de la actividad quinasa puede tomarse de la cantidad del sustrato fosforilado generado como se indica por auto-radiografía en la incorporación de [<sup>32</sup>P]. Como puede verse por las Figuras 11A y 11B, la proteína quinasa N beta natural de longitud total además del dominio quinasa muestran actividad, mientras que no se detectó (Fig. 11A) o se detectó actividad de fondo de quinasa no específicas (Fig. 11B) con las proteínas mutantes KE de longitud total y TA de longitud total, respectivamente.

Resumiendo, el uso de ambas proteínas quinasa N beta naturales de longitud total además del dominio quinasa como se describe en este documento, son dianas adecuadas o medios para el diseño de un procedimiento de cribado en formato HTS. Las respectivas etapas comprenderían por consiguiente

a) generar proteína purificada recombinante de proteína quinasa N beta por expresión en un sistema de expresión no bacteriano tal como sistema celular de insecto (ejemplo para quinasa diferentes en Klippel *et al.*, 1987), en vista del hecho de que la proteína necesita fosforilarse para mostrar actividad quinasa, que no puede conseguirse fácilmente por la expresión en sistemas bacterianos;

b) inmovilización del sustrato derivado de GSK3 o sustrato similar, e incubar el sustrato con proteína quinasa N beta purificada en presencia de rATP, MgCl<sub>2</sub> e inhibidores en una disolución tamponada;

c) detectar la fosforilación del sustrato por un medio de detección apropiado tal como un anticuerpo como el anticuerpo anti-fosfo-GSK3 opcionalmente después de una serie de lavados y opcionalmente, desarrollo posteriormente de forma adicional en sistemas de ensayo Delfia o Lance (Perkin Elmer), por lo cual el sitio de fosforilación se enlaza por un anticuerpo marcado con Europio. La cantidad de Europio enlazado se cuantifica entonces por análisis de fluorescencia con resolución temporal.

### Ejemplo 12

#### *Determinación del nivel de expresión de PKN-beta endógeno*

En este ejemplo, se da la evidencia experimental de que la PKN-beta se expresa de una manera dependiente de la PI3-quinasa. La expresión dependiente de PI 3-quinasa de ARN de PKNbeta mostrada en la Figura 3 se confirma aquí de forma adicional a nivel de proteína.

Se cultivaron células PC-3 como se describe en el ejemplo 1 en este documento. Dichas células PC-3 son PTEN -/-. Se obtuvieron células HeLa de la Colección de Cultivos Tipo Americanos (ATCC) y se hicieron crecer como se describe en Sternberger *et al.* (2002). Se llevaron a cabo transfecciones en placas de 10 cm (confluencia de 30% a 50%) usando Fugene 6 (Roche, Nutley, NJ) según las instrucciones del fabricante. Las células cultivadas se tripsinaron y se cosecharon después de parar el efecto de la tripsina por el medio.

Ambos tipos de células, es decir, células PC-3 y células HeLa, se trataron durante los tiempos indicados con LY294002 10 μM o DMSO, por lo cual se usó DMSO como el disolvente para el LY294002, y por esto, como control negativo.

Los extractos resultantes se fraccionaron por SDS-PAGE y se analizaron posteriormente por Western-blot. Los niveles de las proteínas indicadas tales como p110, que servía como un control de carga, PKN-beta endógeno y Akt fosforilado, se detectaron usando los respectivos anticuerpos.

## ES 2 319 894 T3

El Akt fosforilado (P\*-Akt) sirve como un control para la eficacia del tratamiento mediado por LY294002.

Los resultados se representan en la Fig. 12.

5 En células PC-3, la inhibición de PI-3-quinasa provocó una visible reducción de la expresión de la PKNbeta endógena después de 24 h, los niveles de proteína se redujeron adicionalmente después de 48 h de tratamiento. En las células HeLa, que expresan mayores cantidades de proteína PKNbeta, este efecto es menos dramático, aunque pueden detectarse cantidades reducidas después de 48 h de tratamiento con LY294002.

10 A partir de esto puede concluirse que la PI3-quinasa controla la expresión de PKN-beta.

### Ejemplo 13

15 *La actividad de PKN-beta necesita PI3-quinasa*

La PKN-beta natural recombinante o derivados de PKN-beta (como se describe en las figuras 10-11) se expresaron de forma transitoria en células HeLa. Dichos derivados fueron el derivado TA y el derivado KE de la PKN-beta como se describe en el ejemplo 10 en este documento. La PKN-beta se modificó en cada caso por una etiqueta de myc como se describe anteriormente que permitió la precipitación de la PKN-beta y sus derivados usando un anticuerpo anti-Myc.

20 Para la evaluación de la actividad de PKN-beta, se llevó a cabo una actividad quinasa *in vitro* que usa los precipitados inmunes como se describe anteriormente. La mitad de los precipitados se sometieron a la reacción de quinasa *in vitro*, la segunda mitad se analizó por Western-blot usando anticuerpos anti-fosfo-PRK. El filtro se quitó y se volvió a sondear usando el antisuero anti-PKN-beta. Se analizaron los niveles de fosfo-p70 S6 quinasa a partir de alícuotas de lisatos celulares, que se retiraron más pronto, para confirmar la eficacia del tratamiento de LY294002 incluso después de solo 3 h de tratamiento. El anticuerpo anti-fosfo p70 se obtuvo a partir de señalización celular.

30 Como puede verse a partir de la Fig. 13, el tratamiento con LY294002 lleva a una fuerte inhibición de la actividad quinasa de la PKNbeta, medida aquí de nuevo por fosforilación de MBP. Este efecto fue visible después de solo 3 h de tratamiento, a las 24 h la actividad de PKNbeta estaba casi completamente inhibida. La fosforilación de PKNbeta en la posición 718 también se comprometió después de la inhibición de la PI 3-quinasa por LY294002, sin embargo, este efecto fue menos pronunciado que el efecto en la actividad quinasa.

35 El derivado TA de PKN-beta sirve como control inactivo como se muestra anteriormente, y como control para la especificidad del anticuerpo anti-fosfo PRK para la fosfo-treonina en la posición 718 (P\*-PK).

40 El derivado KE de PKN-beta sirve como control deficiente de quinasa como se describe anteriormente. Su estatus de fosforilación aparece también afectado en alguna extensión por el tratamiento con LY294002. Esto indica que la quinasa, que es responsable de fosforilar la PKNbeta en la posición 718, lo hace de un modo dependiente de PI 3-quinasa.

45 Lo que es más importante, este experimento muestra que la PKNbeta no solo se regula por la PI 3-quinasa por medio de su nivel de expresión (véase Figuras 3 y 12), también se regula a nivel de su activación. Estos descubrimientos indican que la PKNbeta representa una diana posterior "perfecta" para la interferencia con una ruta de PI 3-quinasa hiperactiva para la intervención terapéutica, ya que es exquisitamente dependiente de la PI 3-quinasa, regulándose por ella a diversos niveles. Esto permite la generación de compuestos que muestran un efecto distinto tanto en la proteína PKN-beta como el ácido nucleico que la codifica. Incluso más importante, esta clase de modulación de actividad de PKN-beta en la translación más que a nivel de transcripción, es decir, al nivel de la proteína expresada, parece ser más destacado y más duradero que el impacto al nivel de transcripción.

50 El método de cribado adicional según la presente invención se basa en este punto de vista particular y usa preferiblemente el ensayo de quinasa *in vitro* radiactivo y no radiactivo como lectura de salida.

55

### Ejemplo 14

*Señales de localización de la PKN-beta*

60

En este experimento, la localización de diversos derivados de PKN-beta se comparó a la localización de PKN-beta natural. La Fig. 14 muestra dibujos, por lo cual la distribución celular de PKNbeta y derivados de la misma tal como PKN beta natural (Fig. 14A), derivado TA de PKN beta (Fig. 14B), derivado KE de PKN beta (Fig. 14C) y deltaN de PKN beta (Fig. 14D) se investigó por microscopia de fluorescencia confocal. Los derivados recombinantes marcados con HA de PKNbeta se expresaron de forma transitoria en células HeLa durante 48 h. Después del fijado y la permeabilización, se detectó la expresión de las proteínas recombinantes usando un anticuerpo anti-HA seguido por un anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC. Las células se tiñeron marcando la actina citoesquelética con rodaminafaloidina.

65

## ES 2 319 894 T3

Los resultados se representaron en las Figs. 14A a 14D, por lo cual el dibujo respectivo de cada lado izquierdo del dúplex de dibujos se relacionó a un dibujo de células en la excitación específica por FITC y el dibujo derecho ilustra la mismas células en la excitación usando una longitud de onda específica para Rodamina-faloidina. La tinción con FITC indica células transfectadas con la respectiva proteína recombinante. La tinción de Rodamina-faloidina muestra células transfectadas y no transfectadas.

Como puede tomarse de la Fig. 14A, la PKN-beta natural se localiza predominantemente en el núcleo de la célula. El sitio de fosforilación mutante de TA de PKN-beta y el mutante KE, ambos son deficientes en quinasa, no se concentran más dentro del núcleo en comparación con la PKN-beta natural, sino que se extienden bastante por toda la célula. Finalmente, como se representa en la Fig. 14D, el derivado  $\Delta N$  de PKN-beta, que carece del tercer N-terminal de la molécula y es también deficiente en quinasa (véase Figura 9), está esencialmente excluido del núcleo.

Estos datos indican que la verdadera localización nuclear de PKNbeta en el núcleo es dependiente de su capacidad para actuar como una molécula quinasa activa e implica la presencia de su dominio N-terminal. Esto implica que la PI-3 quinasa regularía también su localización celular.

Las características de la presente invención descritas en la memoria, el listado de secuencias, las reivindicaciones y/o los dibujos pueden ser, o bien de forma separada o en cualquier combinación de los mismos, material para realizar la invención en diversas formas de la misma.

## ES 2 319 894 T3

### REIVINDICACIONES

5 1. El uso *in vitro* de proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, por el cual dicho fragmento desarrolla los efectos de proteína quinasa N beta, como una diana posterior de la ruta de la PI 3-quinasa, preferiblemente como una diana de fármaco posterior de la ruta de la PI 3-quinasa.

10 2. El uso *in vitro* de proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, por el cual dicho fragmento desarrolla los efectos de una proteína quinasa N beta, como una diana posterior de la ruta de la PI 3-quinasa en un proceso de cribado.

15 3. El uso de proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, por el cual dicho fragmento desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas.

25 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la proteína quinasa N beta tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO. 1 o según la entrada de la base de datos PID g7019489 o entrada de la base de datos gi 7019489, o una parte de las mismas.

30 5. El uso de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, o un fragmento del mismo, por el cual dicho fragmento desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas.

40 6. El uso según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la proteína quinasa N beta tiene una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO. 1 o según la entrada de la base de datos PID g7019489 o la entrada de la base de datos gi 7019489, o una parte de las mismas.

45 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, **caracterizado** porque el ácido nucleico es un ácido nucleico según la SEQ ID NO. 2 o según las entradas de la base de datos gi 7019488 o NM\_01335, preferiblemente N\_01335.1.

50 8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, en el que la proteína quinasa N beta está codificada por un ácido nucleico según la SEQ ID NO. 2 o según las entradas de la base de datos gi 7019488 o N\_01335, preferiblemente N\_01335.1.

9. El uso según la reivindicación 5, en el que la secuencia de ácido nucleico, salvo por la degeneración del código genético, hibridaría al ácido nucleico como se especifica en la reivindicación 5.

55 10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de ácido nucleico es una secuencia nucleica que hibrida bajo condiciones astringentes a la secuencia de ácido nucleico o parte de la misma, según la SEQ ID NO. 2 o según las entradas de la base de datos gi 7019488 o NM\_01335, preferiblemente NM\_01335.1.

60 11. El uso según una de las reivindicaciones 3 a 10, **caracterizado** porque la enfermedad está **caracterizada** porque las células que están implicadas en dicha enfermedad carecen de actividad PTEN, muestran un comportamiento agresivo aumentado o son células de un tumor en una etapa tardía.

12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en el que la enfermedad es un tumor en una etapa tardía.

65 13. Un método para el cribado de un agente para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y/o para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por la cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa que comprende las etapas:

## ES 2 319 894 T3

a) proporcionar un compuesto candidato,

b) proporcionar un sistema de expresión para la proteína quinasa N beta y/o un sistema para detectar la actividad de la proteína quinasa N beta;

5

c) poner en contacto el compuesto candidato con el sistema de expresión para la proteína quinasa N beta y/o el sistema para detectar la actividad de la proteína quinasa N beta;

10

d) determinar si la expresión y/o la actividad de la proteína quinasa N beta se cambia bajo la influencia del compuesto candidato.

14. El método según la reivindicación 13, **caracterizado** porque el compuesto candidato está contenido en una biblioteca de compuestos.

15

15. El método según las reivindicaciones 13 o 14, **caracterizado** porque el compuesto candidato se selecciona del grupo de clases de compuestos que comprende péptidos, proteínas, anticuerpos, anticalinas, ácidos nucleicos funcionales, compuestos naturales y moléculas pequeñas.

20

16. El método según la reivindicación 15, **caracterizado** porque los ácidos nucleicos funcionales se seleccionan del grupo que comprende aptómeros, aptazimas, ribozimas, spiegelmeros, oligonucleótidos antisentido y siARN.

25

17. El uso de un anticuerpo contra la proteína quinasa N beta o una parte de la misma cuyo anticuerpo interactúa con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluye la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamartomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas.

30

35

18. El uso de un anticuerpo contra la proteína quinasa N beta o parte de la misma cuyo anticuerpo interactúa con la proteína quinasa N beta o parte de la misma, para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende de cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamartomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas.

40

45

19. El uso de un ácido nucleico que interactúa con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para el desarrollo de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamartomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas, y por lo cual el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende aptómeros y spiegelmeros.

50

55

60

20. El uso de un ácido nucleico que interactúa con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, hamartomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes,

65

## ES 2 319 894 T3

carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas, y por lo cual el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende aptómeros y spielgemeros.

21. El uso de un ácido nucleico que interactúa con proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Freumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, harmatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas, y por lo cual el ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende aptómeros y spiegelmeros.

22. El uso de un ácido nucleico que interactúa con un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, harmatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas, y por lo cual el ácido nucleico que interactúa es un oligonucleótido antisentido, un ribozima y/o siARN.

23. El uso de un ácido nucleico que interactúa con un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para la fabricación de un agente diagnóstico para la diagnosis de una enfermedad, por lo cual la enfermedad se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho proceso patológico consiste en cáncer de endometrio, carcinomas colorrectales, gliomas, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovario, cáncer de próstata, síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos), enfermedades de macrocefalia-hamartoma que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Rily (BRR), lesiones mucocutáneas tales como triquilemomas, macrocefalia, retraso mental, harmatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas tiroideos, enfermedad fibroquística de la mama, gangliocitoma displásico cerebeloso, cánceres de mama y de tiroides y carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas, y por lo cual el ácido nucleico que interactúa es un oligonucleótido antisentido, un ribozima y/o siARN.

24. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, **caracterizado** porque el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte de la misma es el cADN, mARN o hnARN.

25. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, por el que el ácido nucleico que interactúa es siARN que tiene una longitud de 15 a 25 nucleótidos.

26. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, por el que la proteína quinasa N beta y/o el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta es una descrita en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

27. El método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que la proteína quinasa N beta y/o el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta es la que se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

28. El uso de un equipo para la caracterización *in vitro* de una enfermedad o un proceso que se selecciona del grupo que comprende cánceres metastáticos y cualquier proceso patológico que implica la ruta de la PI 3-quinasa, por lo cual dicho equipo comprende al menos un agente que se selecciona del grupo que comprende la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, anticuerpos específicos para la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, polipéptidos que interactúan con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, polipéptidos que interactúan con un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, ácidos nucleicos que interactúan con la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, ácidos nucleicos que interactúan con un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, por lo cual dicha parte de la proteína quinasa N beta desarrolla los efectos de la proteína quinasa N beta, y opcionalmente al menos otro compuesto.

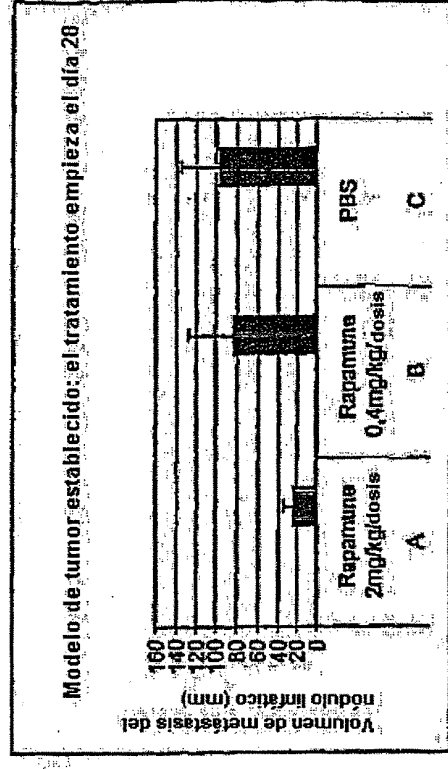
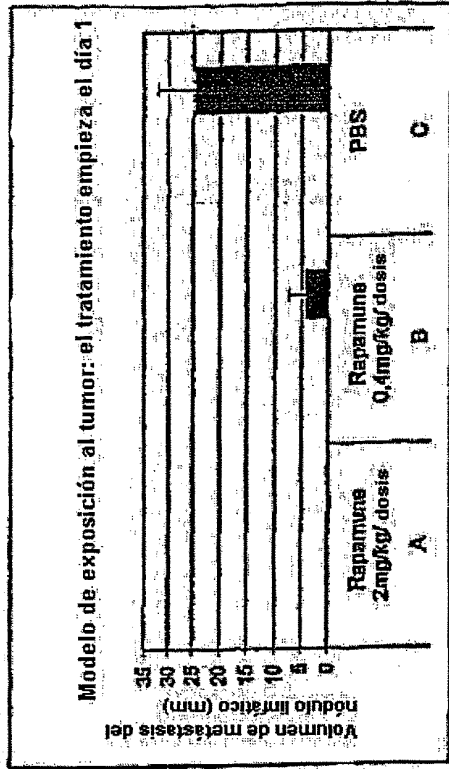


Fig. 2

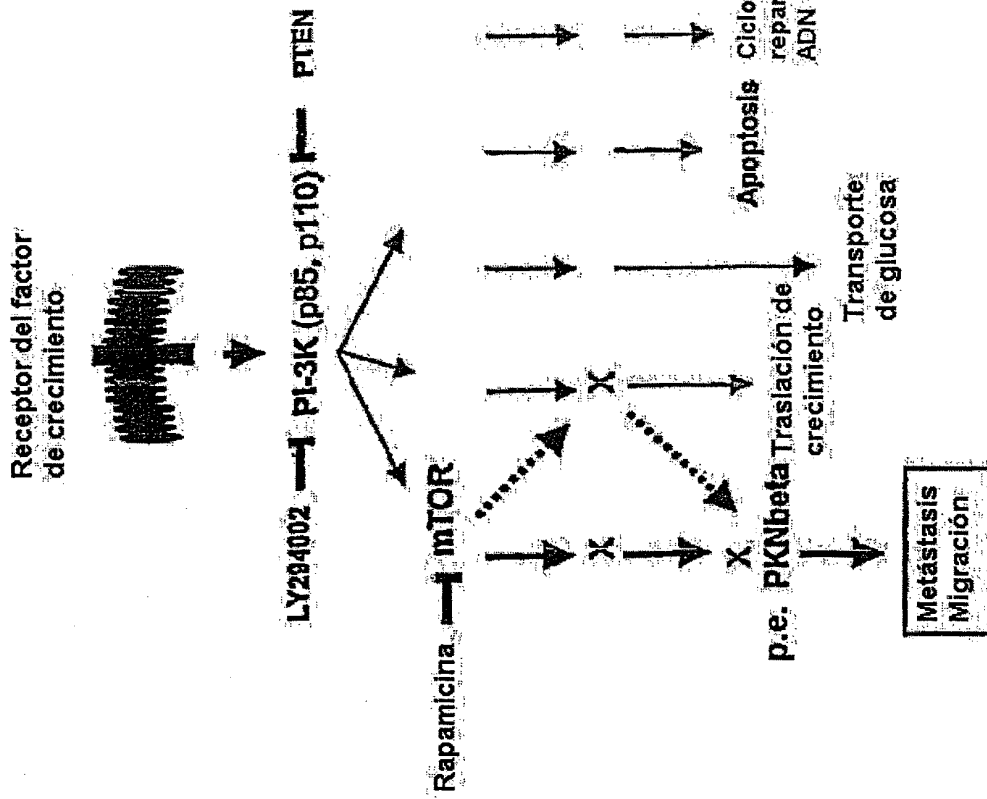
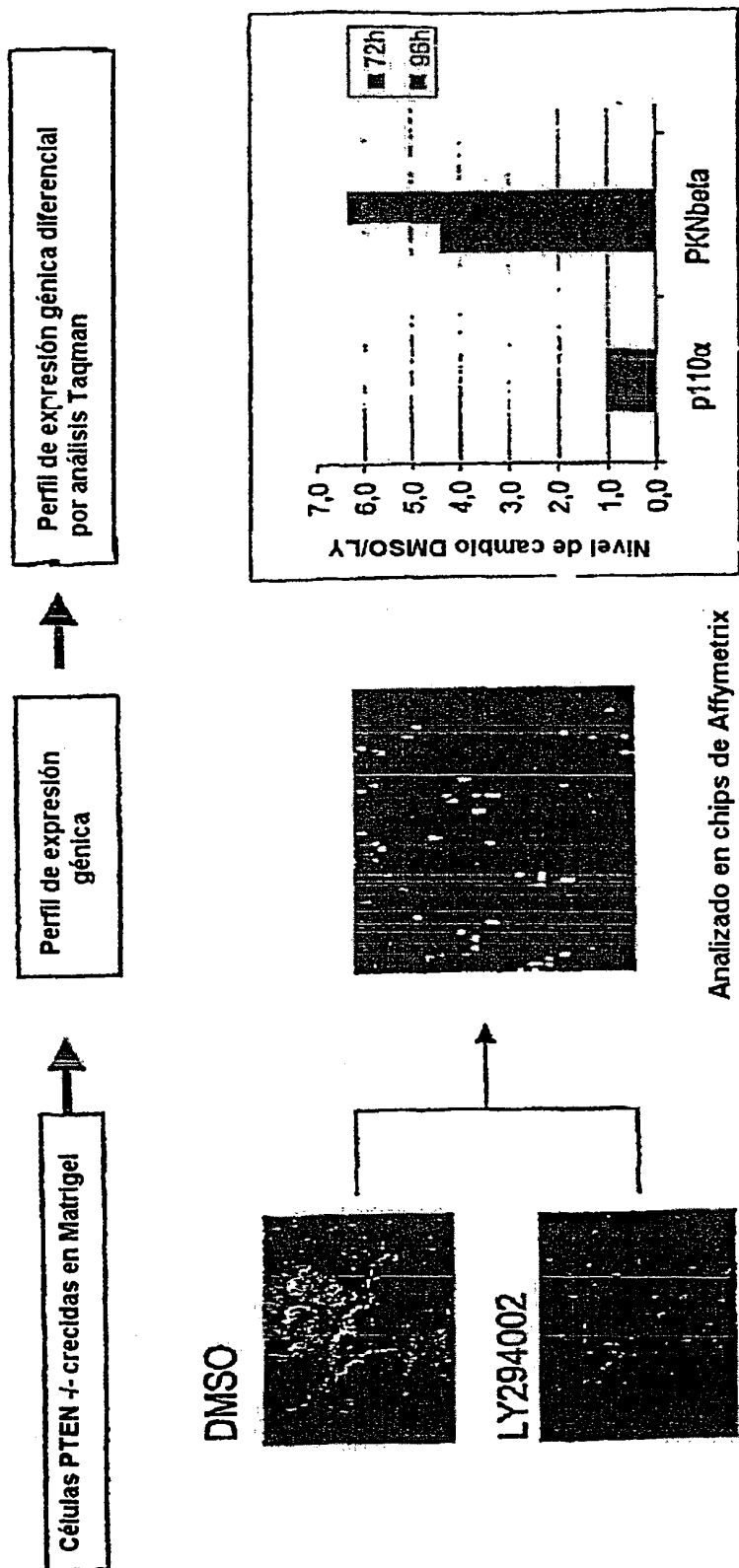


Fig. 1



ARN aislado a partir de células PC3 tratadas de forma diferencial

Fig. 3

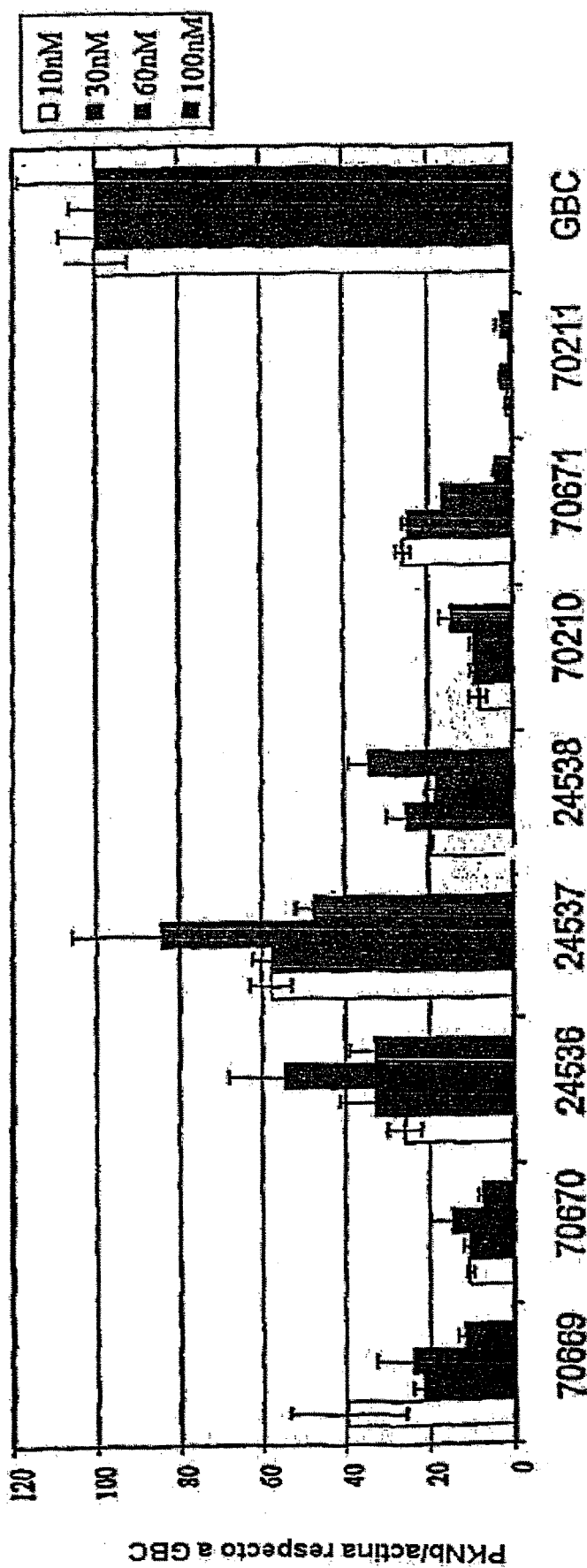
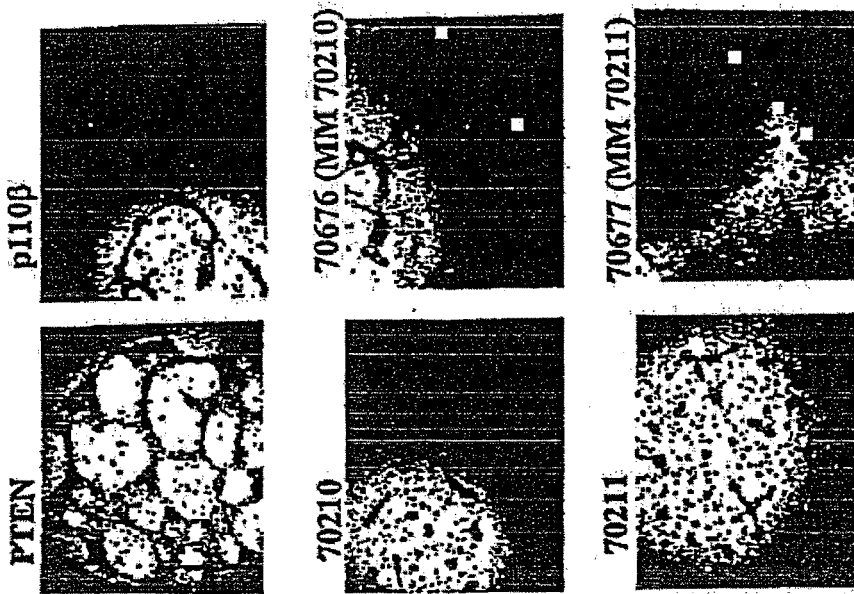


Fig.4

Crecimiento en Matrigel



Disminución de mRNA

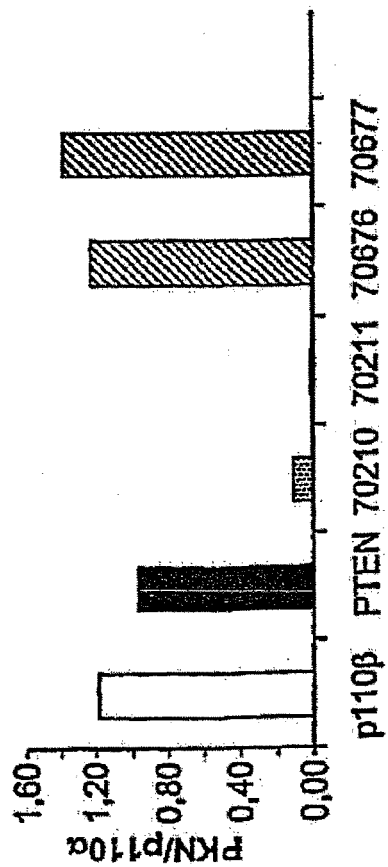
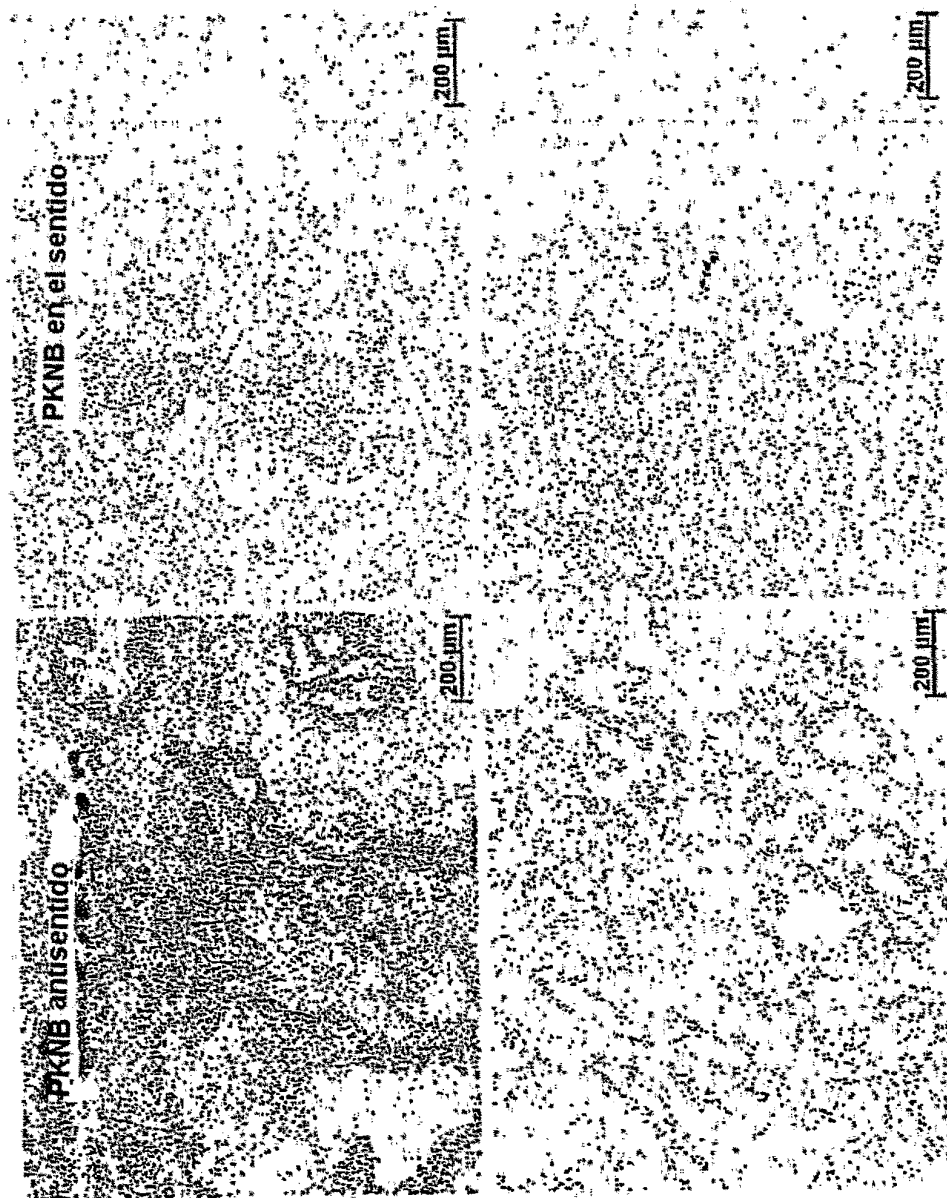


Fig. 5





**AW  
24227  
Tumor de  
próstata**

**AW  
21619  
Próstata  
normal**

**Fig. 7**

Análisis Fenotípico

Modelo de tumor de próstata ortotópico (N=8)

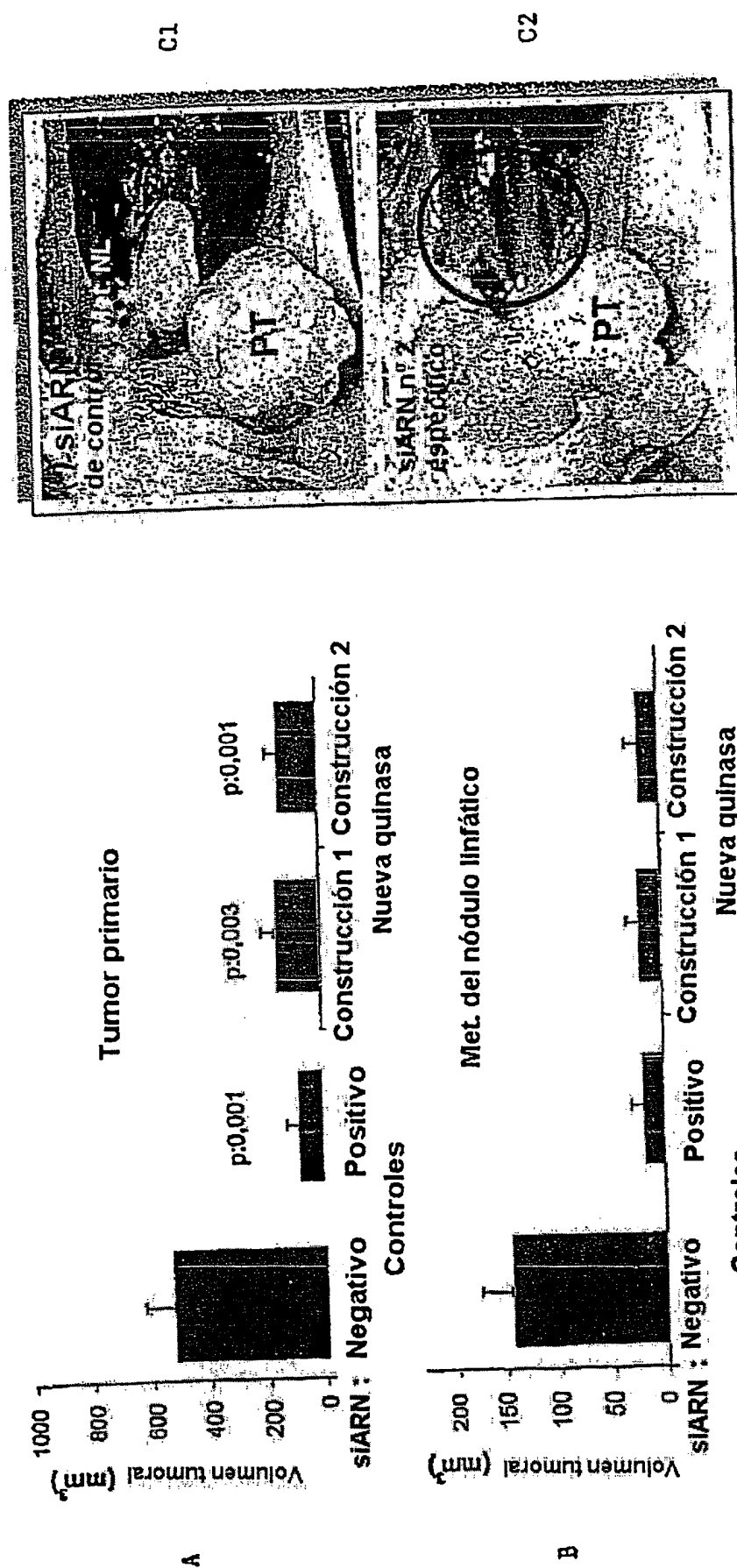
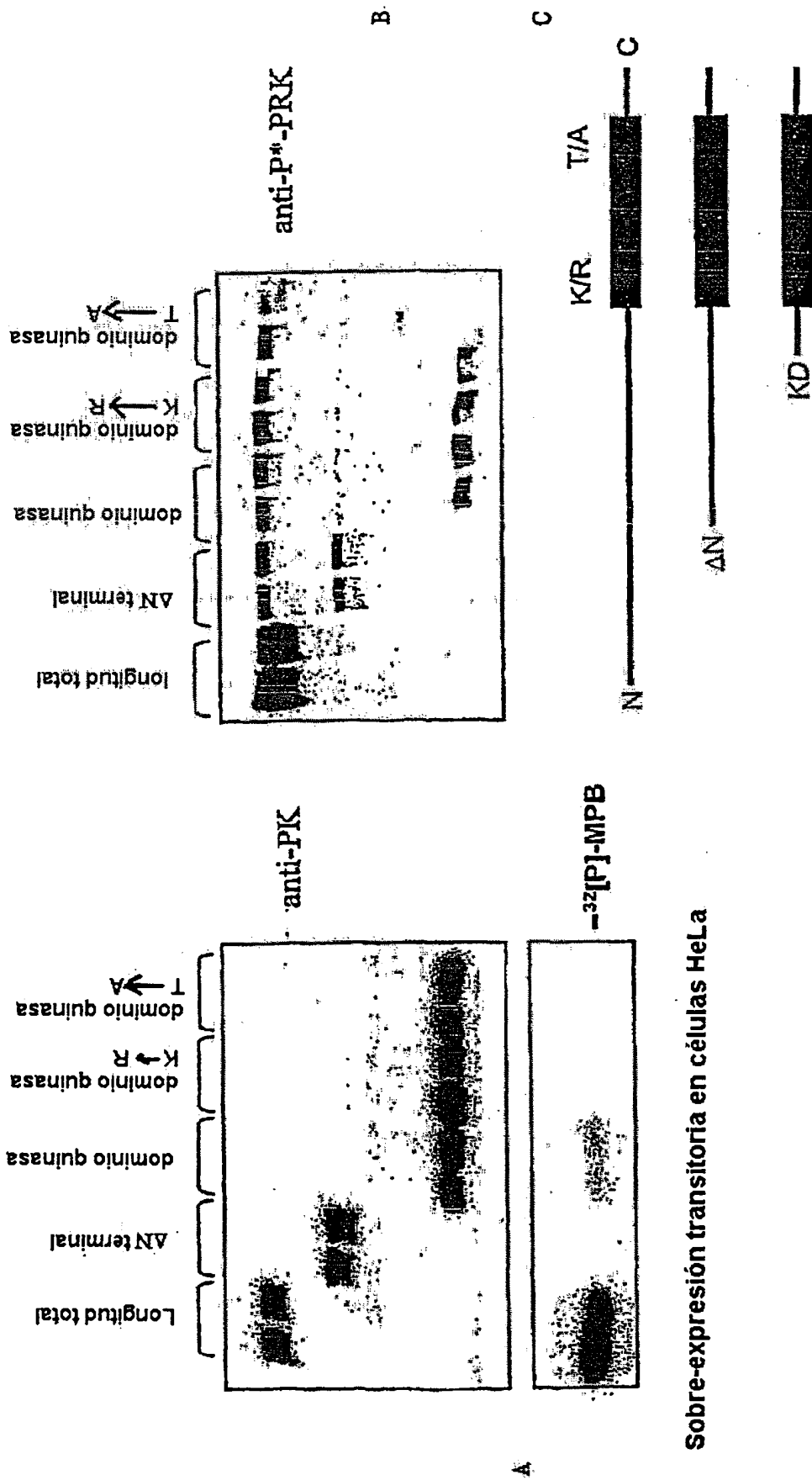


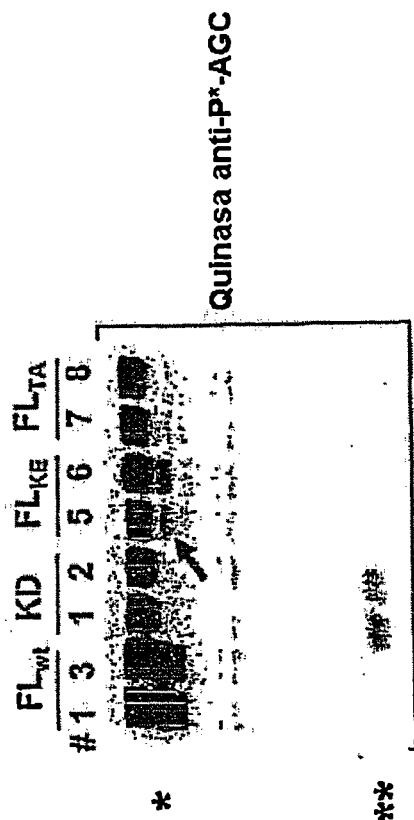
Fig. 8



Sobre-expresión transitoria en células HeLa

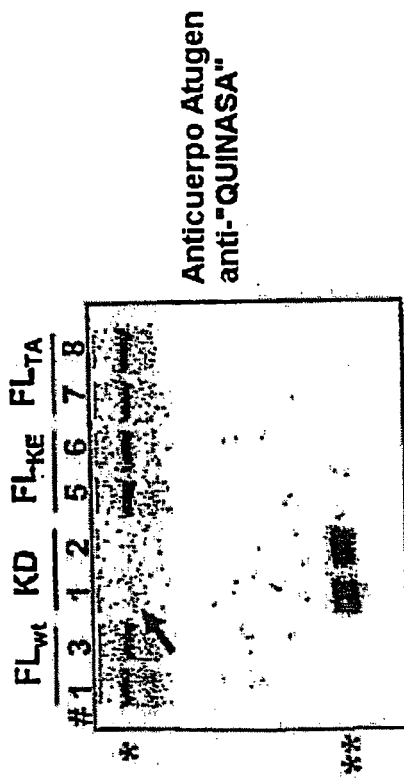
Fig. 9

**B. Fosforilación In Vivo de "QUINASA" recombinante**



Homología a la familia AGC de las moléculas quinasa

**A. Expresión de "QUINASA" recombinante Western Blot**



FL, "QUINASA" de longitud total  
 KD, Dominio "QUINASA"  
 FL<sub>KE</sub>, mutación Lys → Glu en dominio "QUINASA"  
 FL<sub>TA</sub>, mutación Thr → Ala en el bucle de activación

Fig. 10

**Ensayo de inmunoprecipitación con etiqueta anti-Myc/quinasas in vitro:**

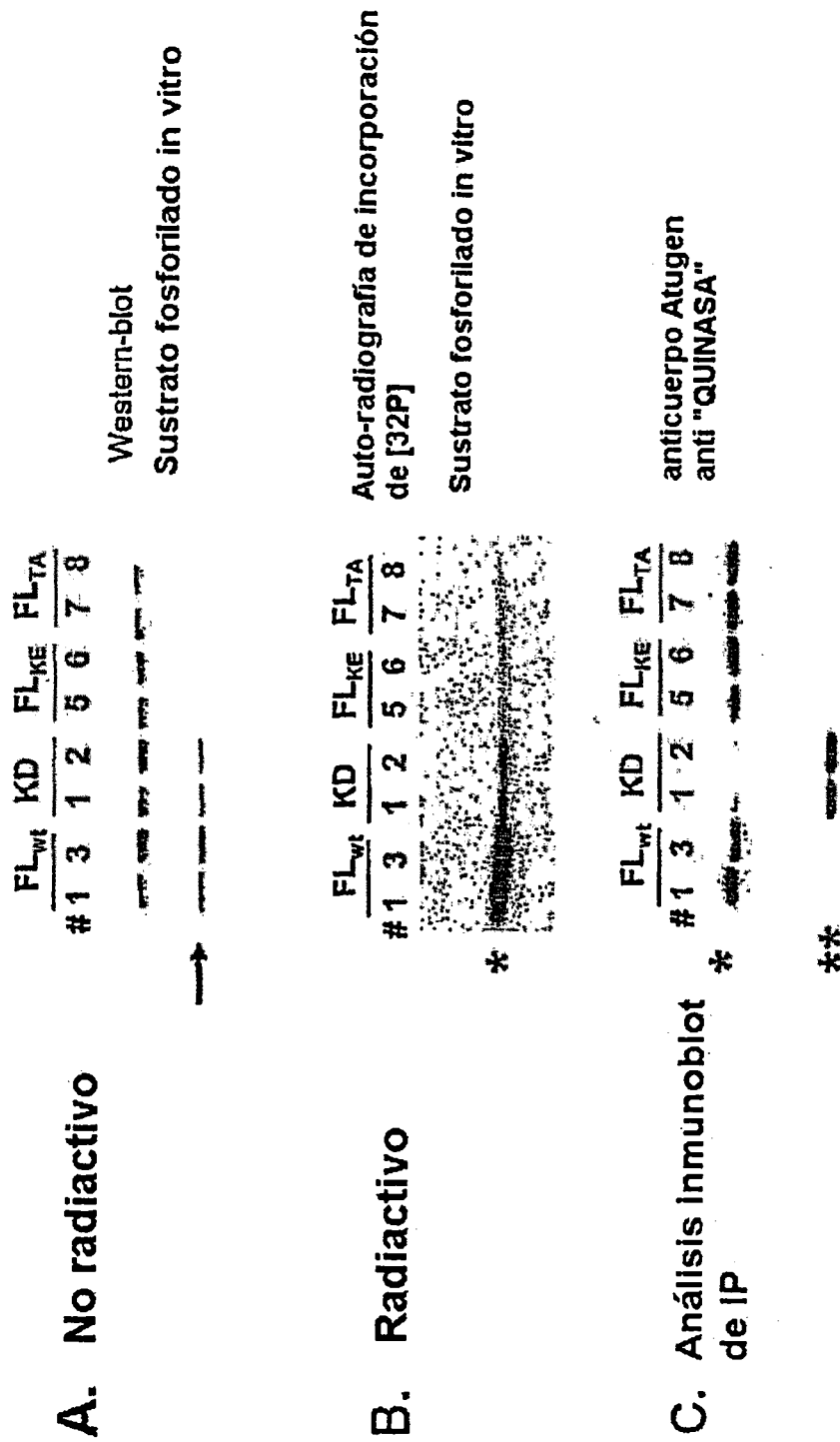


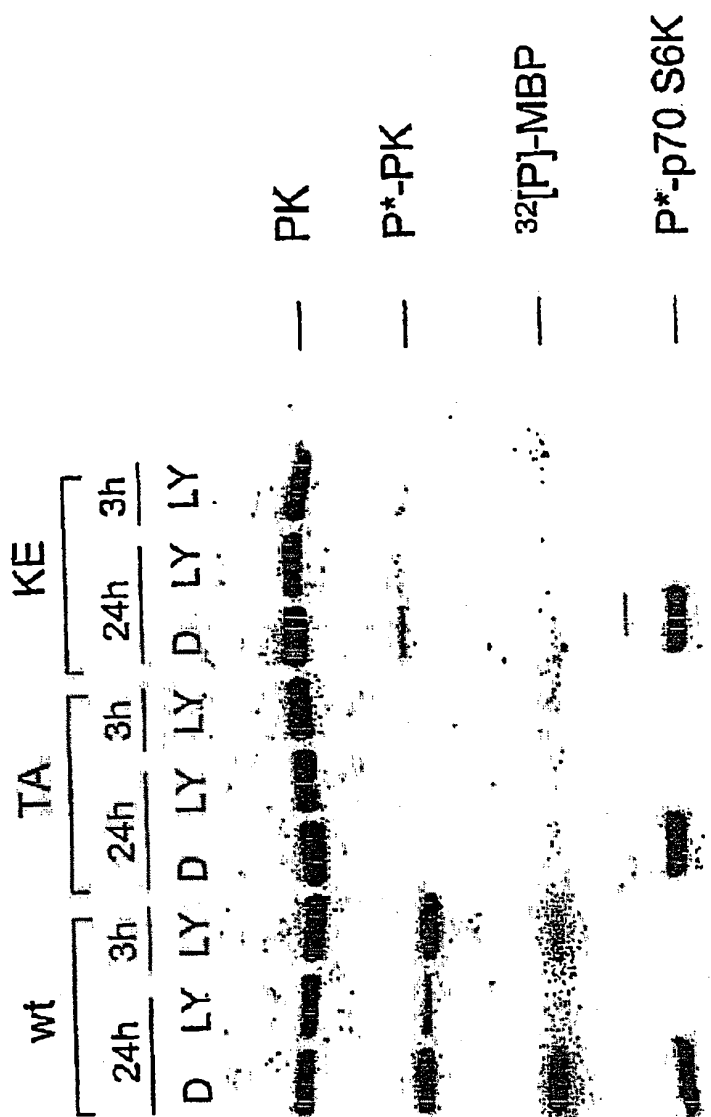
Fig. 11

Expresión de PK dependiente de PI 3-quinasa



Fig. 12

**Se necesita PI 3-quinasa para la actividad PK**



anti-Myc IP:  
 Ensayo de quinasa por  
 Western-blot/in vitro

Fig. 13

**La localización nuclear de PK es dependiente de la actividad quinasa y el N-terminal**

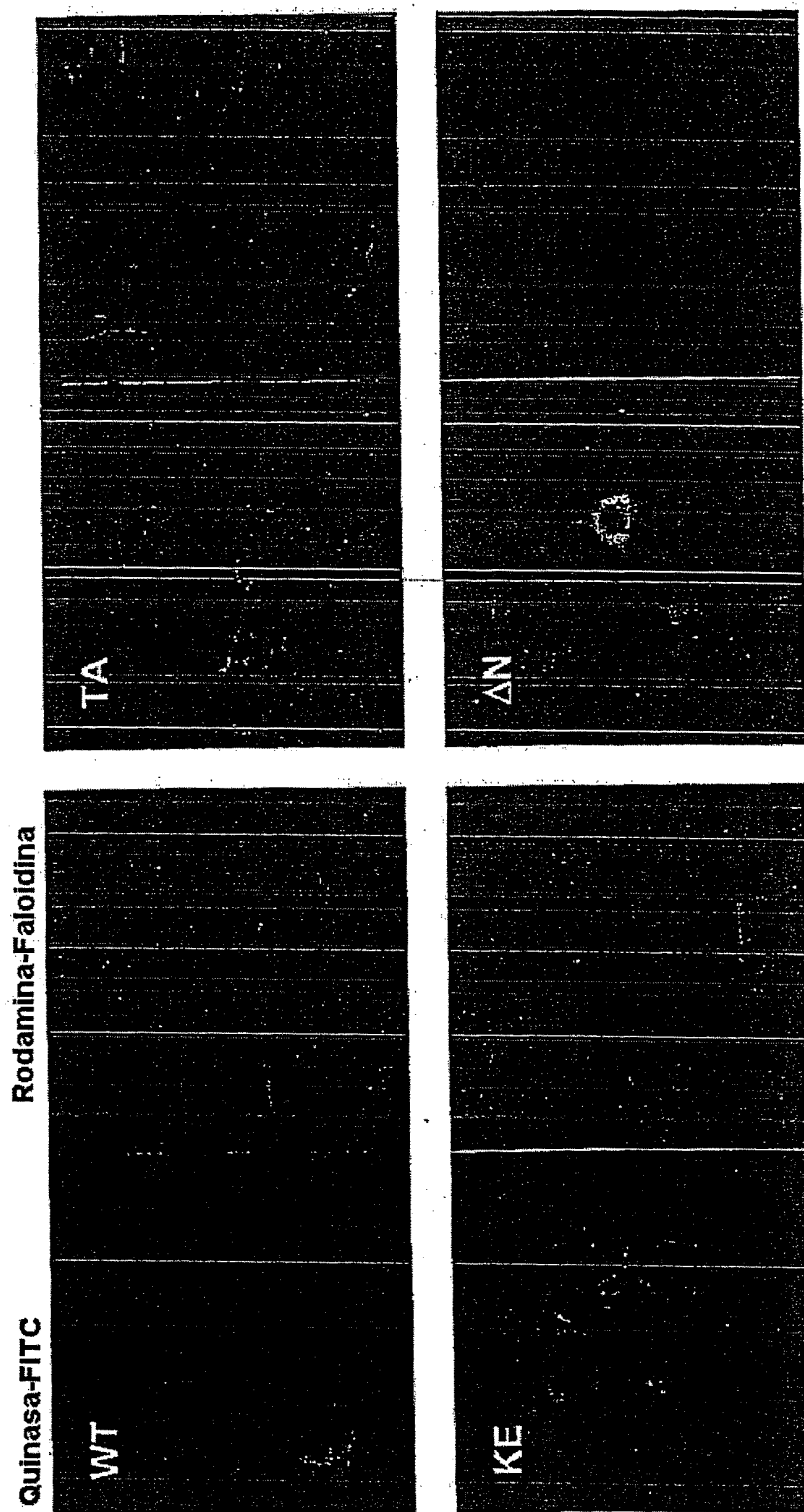


Fig. 14



ES 2 319 894 T3

Met Lys Ile Ser Ser Leu Glu Ala Ser Gly Ser Pro Glu Pro Gly Pro  
 165 170 175

5  
 Glu Leu Leu Ala Glu Glu Leu Gln His Arg Leu His Val Glu Ala Ala  
 180 185 190

10  
 Val Ala Glu Gly Ala Lys Asn Val Val Lys Leu Leu Ser Ser Arg Arg  
 195 200 205

15  
 Thr Gln Asp Arg Lys Ala Leu Ala Glu Ala Gln Ala Gln Leu Gln Glu  
 210 215 220

20  
 Ser Ser Gln Lys Leu Asp Leu Leu Arg Leu Ala Leu Glu Gln Leu Leu  
 225 230 235 240

25  
 Glu Gln Leu Pro Pro Ala His Pro Leu Arg Ser Arg Val Thr Arg Glu  
 245 250 255

30  
 Leu Arg Ala Ala Val Pro Gly Tyr Pro Gln Pro Ser Gly Thr Pro Val  
 260 265 270

35  
 Lys Pro Thr Ala Leu Thr Gly Thr Leu Gln Val Arg Leu Leu Gly Cys  
 275 280 285

40  
 Glu Gln Leu Leu Thr Ala Val Pro Gly Arg Ser Pro Ala Ala Ala Leu  
 290 295 300

45  
 Ala Ser Ser Pro Ser Glu Gly Trp Leu Arg Thr Lys Ala Lys His Gln  
 305 310 315 320

50  
 Arg Gly Arg Gly Glu Leu Ala Ser Glu Val Leu Ala Val Leu Lys Val  
 325 330 335

55  
 Asp Asn Arg Val Val Gly Gln Thr Gly Trp Gly Gln Val Ala Glu Gln  
 340 345 350

60  
 Ser Trp Asp Gln Thr Phe Val Ile Pro Leu Glu Arg Ala Arg Glu Leu  
 355 360 365

65  
 Glu Ile Gly Val His Trp Arg Asp Trp Arg Gln Leu Cys Gly Val Ala  
 370 375 380

70  
 Phe Leu Arg Leu Glu Asp Phe Leu Asp Asn Ala Cys His Gln Leu Ser  
 385 390 395 400

75  
 Leu Ser Leu Val Pro Gln Gly Leu Leu Phe Ala Gln Val Thr Phe Cys  
 405 410 415

ES 2 319 894 T3

Asp Pro Val Ile Glu Arg Arg Pro Arg Leu Gln Arg Gln Glu Arg Ile  
 420 425 430  
 5  
 Phe Ser Lys Arg Arg Gly Gln Asp Phe Leu Arg Arg Ser Gln Met Asn  
 435 440 445  
 10  
 Leu Gly Met Ala Ala Trp Gly Arg Leu Val Met Asn Leu Leu Pro Pro  
 450 455 460  
 15  
 Cys Ser Ser Pro Ser Thr Ile Ser Pro Pro Lys Gly Cys Pro Arg Thr  
 465 470 475 480  
 20  
 Pro Thr Thr Leu Arg Glu Ala Ser Asp Pro Ala Thr Pro Ser Asn Phe  
 485 490 495  
 25  
 Leu Pro Lys Lys Thr Pro Leu Gly Glu Glu Met Thr Pro Pro Pro Lys  
 500 505 510  
 30  
 Pro Pro Arg Leu Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Thr Ser Glu Glu Thr Pro  
 515 520 525  
 35  
 Arg Thr Lys Arg Pro His Met Glu Pro Arg Thr Arg Arg Gly Pro Ser  
 530 535 540  
 40  
 Pro Pro Ala Ser Pro Thr Arg Lys Pro Pro Arg Leu Gln Asp Phe Arg  
 545 550 555 560  
 45  
 Cys Leu Ala Val Leu Gly Arg Gly His Phe Gly Lys Val Leu Leu Val  
 565 570 575  
 50  
 Gln Phe Lys Gly Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Ile Lys Ala Leu Lys Lys  
 580 585 590  
 55  
 Gln Glu Val Leu Ser Arg Asp Glu Ile Glu Ser Leu Tyr Cys Glu Lys  
 595 600 605  
 60  
 Arg Ile Leu Glu Ala Val Gly Cys Thr Gly His Pro Phe Leu Leu Ser  
 610 615 620  
 65  
 Leu Leu Val Cys Phe Gln Thr Ser Ser His Ala Arg Phe Val Thr Glu  
 625 630 635 640  
 Phe Val Pro Gly Gly Asp Leu Met Met Gln Ile His Glu Asp Val Phe  
 645 650 655  
 Pro Glu Pro Gln Ala Arg Phe Tyr Val Ala Cys Val Val Leu Gly Leu  
 660 665 670

ES 2 319 894 T3

Gln Phe Leu His Glu Lys Lys Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Asp  
 675 680 685  
 5  
 Asn Leu Leu Leu Asp Ala Gln Gly Phe Leu Lys Ile Ala Asp Phe Gly  
 690 695 700  
 10  
 Leu Cys Lys Glu Gly Ile Gly Phe Gly Asp Arg Thr Ser Thr Phe Cys  
 705 710 715 720  
 15  
 Gly Thr Pro Glu Phe Leu Ala Pro Glu Val Leu Thr Gln Glu Ala Tyr  
 725 730 735  
 20  
 Thr Gln Ala Val Asp Trp Trp Ala Leu Gly Val Leu Leu Tyr Glu Met  
 740 745 750  
 25  
 Leu Val Gly Glu Cys Pro Phe Pro Gly Asp Thr Glu Glu Glu Val Phe  
 755 760 765  
 30  
 Asp Cys Ile Val Asn Met Asp Ala Pro Tyr Pro Gly Phe Leu Ser Val  
 770 775 780  
 35  
 Gln Gly Leu Glu Phe Ile Gln Lys Leu Leu Gln Lys Cys Pro Glu Lys  
 785 790 795 800  
 40  
 Arg Leu Gly Ala Gly Glu Gln Asp Ala Glu Glu Ile Lys Val Gln Pro  
 805 810 815  
 45  
 Phe Phe Arg Thr Thr Asn Trp Gln Ala Leu Leu Ala Arg Thr Ile Gln  
 820 825 830  
 50  
 Pro Pro Phe Val Pro Thr Leu Cys Gly Pro Ala Asp Leu Arg Tyr Phe  
 835 840 845  
 55  
 Glu Gly Glu Phe Thr Gly Leu Pro Pro Ala Leu Thr Pro Pro Ala Pro  
 850 855 860  
 His Ser Leu Leu Thr Ala Arg Gln Gln Ala Ala Phe Arg Asp Phe Asp  
 865 870 875 880  
 Phe Val Ser Glu Arg Phe Leu Glu Pro  
 885

60 <210> 2  
 <211> 2670  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 65 <220>  
 <221> mARN

# ES 2 319 894 T3

<222> (1)...(2670)

<223> mARN/cADN de PKN beta

5 <400> 2

	atggaggagg gggcgccgcg gcagcctggg ccgagccagt gggccccaga ggatgagaag	60
	gagggtgatcc gccgggccat ccagaaagag ctgaagatca aggaggggggt ggagAACctg	120
10	cgccgctggt ccacagaccg ccgccacttg ggccatgtgc agcagctgct ggggtcctcc	180
	aaccgocgccc tggagcagct gcatggcgag ctgocgggagc tgcacgcccg aatcctgctg	240
	cccggccctg ggccctggccc agctgagcct gtggcctcag gacccccggc gctgggcagag	300
15	cagctcaggg ctccggcacc agaggctctc cggaggcagc tgcattgtga gctgaagggtg	360
	aaacaggggg ctgagaacat gaccacacag tgcgccagtg gcacccccaa ggagagggaag	420
	ctccttgtag ctgccagca gatgctgctg gacagccagc tgaagggtgg cctgctgogg	480
20	atgaagatca gcagcctgga ggccagtggg tccccggagc cagggcctga gctactggcg	540
	gaggagctac agcattgact gcacgttgag gcagcggctg ctgagggcgc caagaacgtg	600
	gtgaaactgc ttagtagccg gagaacacag gaccgcaagg cactggctga gggccaggcc	660
25	cagctacagg agtcctctca gaaactggac ctctgocgce tggccttggg gcagctgctg	720
	gagcaactgc ctctgccc ccctttgccc agcagagtga cccgagagtt gcccggctgcg	780
	gtgctctgat accccagcc ttcagggaca cctgtgaagc ccacogccct aacagggaca	840
30	ctgcaggtcc gcctcctggg ctgtgaacag ttgctgacag ccgtgcttgg gcgctoccca	900
	ggcgccgac tggccagcag cccctccgag ggctggcttc ggaccaaggc caagcaccag	960
	cgtggccgag gcagacttg cagtgaggtg ctgctgtgctc taaagggtga caaccgtgtt	1020
35	gtggggcaga cgggctgggg gcaggtggcc gaacagtcct gggaccagac ctttgtatc	1080
	ccactggagc gaggccctga gctggagatt ggggtacact ggcgggactg gggcagcta	1140
	tgtggcgtgg ccttctgag acttgaagac tctctggaca atgctgtca ccaactgtcc	1200
40	ctcagcctgg taccgaggg actgcttttt gccaggtga cctctgoga tctgtcatt	1260
	gagaggcggc ccggctgca gaggcaggaa cgcattctct ctaaaccgag aggccaggac	1320
	ttcctgaggo gttegcagat gaacctcggc atggcggcct gggggcgcct cgtcatgaa	1380
45	ctgctgcccc cctgcagcto cccgagcaca atcagcccc ctaaaggatg cctcggacc	1440
	ccaacaacac tgcgagaggc ctctgacct gccactccca gtaatttctt gcccaagaag	1500
	accoccttgg gtgaagagat gacaccocca cccaagcccc cagcctcta cctccccag	1560
50	gagccaacat ccgaggagac tccgcgcacc aaacgtcccc atatggagcc taggactoga	1620
	cgtgggcat ctccaccagc ctocccacc aggaacccc ctcgcttca ggacttccgc	1680
	tgttagctg tgcctggcgg gggacacttt gggagggtcc tctgggtcca gttcaagggg	1740
55	acagggaaat actacgccat caagcactg aagaagcagg aggtgctcag ccgggacgag	1800

60

65

## ES 2 319 894 T3

```

atagagagcc tgtactgcga gaagcggatc ctggaggctg tgggctgcac agggcaccct 1860
ttcctgctct ccctccctgt ctgctccag acctccagcc atgcccgctt tgtgactgag 1920
5   tttgtgcctg gtggtgacct catgatgcag atccacgagg atgtcttccc cgagccccag 1980
gcccgcttct acgtggcttg tgttgtcctg gggctgcagt tcttacaga gaagaagatc 2040
10  atttacaggg acctgaagtt ggataacctt ctgctggatg cccagggatt cctgaagatc 2100
gcagactttg gactctgcaa ggaagggatc ggcttcgggg accggactag caccttctgt 2160
15  ggcacccccg agttcctggc tcccgaggtg ctgaccagc aggcatacac acaggccgtc 2220
gactggtggg cgctgggtgt gctgctctac gagatgctgg tgggtgagtg cccggtccca 2280
ggggacacag aggaagaggt gtttgactgc atcgtcaaca tggacgcccc ctaccocggc 2340
20  tttctgtcgg tgcaagggtt tgagttcatt cagaagctcc tccagaagtg cccggagaag 2400
cgcctcgggg cagggtgagca ggatgccgag gagatcaagg tccagccatt cttcaggacc 2460
25  accaactggc aagccctgct cgcccgcac atccagcccc ccttcgtgcc taccctgtgt 2520
ggccctgcgg acctgcgcta ctttgagggc gagttcacag ggctgcccgc tgcctgacc 2580
ccactgcac cccacagcct cctcactgcc cgccaacagg ccgccttcg ggacttcgac 2640
30  tttgtgtcag agcgattcct ggaaccctga 2670

```

<210> 3

35 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> oligonucleótido antisentido

<220>

45 <221> rasgo misceláneo

<222> (1) .. (6)

<223> ARN

50 <220>

<221> rasgo misceláneo

<222> (7) ... (15)

55 <223> AND unido a través de uniones fosforotioato

<220>

<221> rasgo misceláneo

60 <222> (16) ... (21)

<223> ARN

<400> 3

65

ggagguccag ttctgagag g

21

## ES 2 319 894 T3

<210> 4  
<211> 21  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10

<220>  
<221> rasgo misceláneo  
<222> (1) .. (6)  
15 <223> ARN

<220>  
20 <221> rasgo misceláneo  
<222> (7) .. (15)  
<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato

<220>  
25 <221> rasgo misceláneo  
<222> (16) .. (21)  
<223> ARN  
30

<400> 4  
uguuucacct tcaguccac a

35 <210> 5  
<211> 23  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
45

<220>  
<221> rasgo misceláneo  
<222> (1) .. (7)  
50 <223> ARN

<220>  
55 <221> rasgo misceláneo  
<222> (8) ... (16)  
<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato

<220>  
60 <221> rasgo misceláneo  
<222> (17) .. (23)  
<223> ARN  
65

21

## ES 2 319 894 T3

<400> 5

aggacaacac aagccacgua gaa

23

5 <210> 6  
<211> 23  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido

15 <220>  
<221> rasgo misceláneo  
<222> (1) .. (7)

20 <223> ARN

<220>  
<221> rasgo misceláneo  
25 <222> (8) ... (16)  
<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato

30 <220>  
<221> rasgo misceláneo  
<222> (17) ... (23)  
<223> ARN

35 <400> 6

gcucugacac aaagtcgaag ucc

23

40 <210> 7  
<211> 23  
<212> ADN  
45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido

50 <220>  
<221> rasgo misceláneo  
<222> (1) ... (7)

55 <223> ARN

<220>  
<221> rasgo misceláneo  
60 <222> (8) ... (16)  
<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato

65 <220>  
<221> rasgo misceláneo  
<222> (17) ... (23)

## ES 2 319 894 T3

	<223> ARN	
	<400> 7	
5	gcaguc <sup>aaac</sup> acctct <sup>uuccu</sup> cug	23
	<210> 8	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> oligonucleótido antisentido	
	<220>	
20	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (1) ... (6)	
	<223> ARN	
25	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (7) .... (15)	
30	<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato	
	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
35	<222> (16) ... (21)	
	<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato	
	<400> 8	
40	caacac <sup>ggtt</sup> gtccacc <sup>uuu</sup> a	21
	<210> 9	
45	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> oligonucleótido antisentido	
	<220>	
55	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (1) ... (6)	
	<223> ARN	
60	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (7) ... (15)	
65	<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato	
	<220>	

## ES 2 319 894 T3

	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (16) ... (21)	
	<223> ARN	
5	<400> 9	
	ucagugcttt gatggcguag u	21
10	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido antisentido	
20	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (1) ... (6)	
25	<223> ARN	
	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
30	<222> (7) ... (15)	
	<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato	
35	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (16) ... (21)	
	<223> ARN	
40	<400> 10	
	cuucucgcag tacaggcucu c	21
45	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido antisentido	
55	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (1) ... (6)	
60	<223> ARN	
	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
65	<222> (7) ... (15)	
	<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato	

## ES 2 319 894 T3

	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (16) ... (21)	
5	<223> ARN	
	<400> 11	
10	caagacgctt gtcacguuu a	21
	<210> 12	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> oligonucleótido antisentido	
	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
25	<222> (1) ... (6)	
	<223> ARN	
	<220>	
30	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (7) ... (15)	
	<223> ADN unido a través de uniones fosforotioato	
35	<220>	
	<221> rasgo misceláneo	
	<222> (16) ... (21)	
40	<223> ARN	
	<400> 12	
45	ucagagctta gttg'gcguug u	21
50		
55		
60		
65		