

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 637**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08729448 .4**

96 Fecha de presentación: **08.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2118318**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **Mutaciones de Gnaq en el melanoma**

30 Prioridad:

08.02.2007 US 900479 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

12.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

12.12.2012

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (33.3%)
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607, US;
THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (33.3%) y
THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BASTIAN, BORIS C.;
VAN RAAMSDONK, CATHERINE D. y
BARSH, GREGORY S.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 637 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutaciones de *Gnaq* en el melanoma.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EEUU nº 60/900.479, presentada el 8 de febrero de 2007.

Declaración acerca de los derechos a invenciones realizadas en investigaciones o avances con financiación federal

Esta invención se realizó con apoyo del Gobierno a través de la beca nº P01 CA 025874-25-A1 concedida por the National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

El modelo actual de formación del melanoma consiste en que los melanocitos avanzan desde un estado normal a un estado maligno mediante la acumulación de mutaciones en genes de melanoma clave. Véase, Meier, F., et al. (1998), *Frontiers in Bioscience*, 3:D1005-1010. El melanoma puede surgir de modo espontáneo, o dentro de un nevus o lunar preexistente. Los nevi poseen mutaciones en genes de melanoma conocidos y, por tanto, son un factor de riesgo para el desarrollo del melanoma. Véase, por ejemplo, Pollock, P.M., et al. (2003), *Nat. Genet.*, 33(1):19-20; Kumar, R., et al. (2004), *J. Invest. Dermatol.*, 122(2):342-348; Chin, L. (2003), *Nat. Rev. Cancer*, 3(8):559-570.

Se ha demostrado que la mayoría de los melanomas y nevi melanocíticos humanos poseen mutaciones activadoras en los genes BRAF, NRAS, C-KIT, o HRAS. Por ejemplo, el documento WO 2005/059171 describe el uso de una mutación en el gen BRAF para la determinación de la malignidad de células de melanoma. Además, estudios recientes han demostrado que los melanomas se encuadran en grupos genéticamente diferenciados que tienen diferencias marcadas en la frecuencia de la activación de la vía de MPA-quinasa. Véase, Curtin, J.A., et al. (2005), *N. Engl. J. Med.*, 353(20):2135-2147. Una categoría, el melanoma uveal, surge de melanocitos dentro del plexo coroidal del ojo y es biológicamente diferente del melanoma cutáneo por alteraciones citogenéticas características. Véase, Horsman et al. (1993), *Cancer*, 71(3):811. La otra categoría la forman las proliferaciones melanocíticas intradérmicas, que pueden ser congénitas o adquiridas, y se presentan en diversas formas, que varían de lunares azulados discretos (nevi azules) a grandes parches de color azul grisáceo que afectan a la conjuntiva y a la piel periorbital (nevus de Ota), los hombros (nevus de Ito), y la zona lumbar (mancha mongoliana). Véase, Zembowicz, et al. (2004), *Histopathology* 45(5):433. Estas proliferaciones melanocíticas intradérmicas no contienen mutaciones en BRAF ni NRAS, y por tanto tienen una etiología exclusiva cuando se comparan con otros nevi y melanomas. Véase, Ariyanayagam-Baksh S.M., et al. (2003), *Am. J. Dermatopathol.*, 25(1): p. 21-27. Los melanomas uveales muestra una activación de la MAP-quinasa (véase, Zuidervaet et al. (2005), *British J. Cancer*, 92(11):2032) pero generalmente no presentan mutaciones en BRAF, NRAS, o KIT. Aunque el melanoma uveal se diagnostica en EEUU a una tasa de 4,3-6 casos por millón anuales, un estudio previo de 1250 individuos caucásicos con melanoma uveal encontró sólo 17 pacientes (1,4%) con melanocitosis ocular u oculodérmica. Véase, Gonder J.R., et al. (1982), *Ophthalmology*, 89(8): 953-960. Se ha sugerido una conexión potencial entre los neoplasmas melanocíticos intradérmicos y los melanomas uveales por el hecho de que el nevus de Ota es un factor de riesgo para el melanoma uveal y por un solapamiento entre algunas características histomorfológicas de los dos trastornos, y se ha indicado que los dos aparecen juntos. Véase, López, M.T., et al. (1998), *Am. J. Dermatopathol.*, 20:109-110; Singh, A.D., et al. (1998), *Ophthalmol.*, 105(1):195.

En fechas recientes, una investigación de mutagénesis a gran escala en ratones ha identificado varios mutantes de piel oscura (*Dsk*). Véase, Van Raamsdonk C.D., et al. (2004), *Nat. Genet.*, 36: 961-968. Algunos de estos mutantes tienen un fenotipo melanocítico con una proliferación celular escasa de melanocitos intradérmicos que se parece a los nevi azules. Se demostró que las mutaciones eran el resultado de mutaciones en subunidades α de la proteína G.

Las proteínas G representan una gran familia de proteínas heterotriméricas que se encuentran en mamíferos compuestas por subunidades alfa (α), beta (β), y gamma (γ). Véase, Wettschureck, N.A.O.S. (2005), *Physiol. Rev.*, 85(4):1159-1204. La subunidad G- α_q es una de una diversidad de subunidades G-alfa que media en la estimulación de la fosfolipasa C β a través de la unión y la hidrólisis de GTP. Véase, Markby, D.W., et al. (1993), *Science*, 262(1541):1895-1901. Se ha propuesto la hipótesis de que la activación de G- α_q estimula la supervivencia de los melanocitos en la dermis. Véase, Van Raamsdonk, C.D., et al. (2004). Esto resulta coherente con la observación en ratones de que la hiperactividad de G- α_q aumenta el número de melanoblastos, melanocitos inmaduros, que migran en la dermis sin aumentar su tasa mitótica. Véase, Van Raamsdonk, C.D., et al. (2004).

Las mutaciones hipermórficas en la línea germinal en G α_q en ratones provocan hiperpigmentación dérmica, sin alterar la pigmentación epidérmica. Por ejemplo, se considera que las mutaciones *Gnaq^{Dsk1}* y *Gnaq^{Dsk10}* son hiperactivas, en lugar de constitutivas, porque no se producen en aminoácidos fundamentales para la actividad

GTPasa y siguen siendo dependientes de una proteína G activa acoplada al receptor de endotelina B. Véase, Van Raamsdonk, C.D., et al. (2004). De manera notable, ratones *Gnaq*^{Dsk1} y *Gnaq*^{Dsk10} no desarrollan tumores. Véase, Van Raamsdonk, C.D., et al. (2004). Sin embargo, el bloqueo de la actividad GTPasa a través de la sustitución de aminoácidos críticos puede producir una activación constitutiva. Véase, Markby, D.W., et al. (1993). Por ejemplo, una mutación de Q227 en Gas (Gnas) provoca una actividad constitutiva en tumores de pituitaria humanos. Véase, Landis, C.A., et al. (1989), Nature 340(6236):692-696.

Ratones transgénicos que expresan de modo ectópico el receptor acoplado a proteína G *Grm-1* en melanocitos presentan hiperpigmentación dérmica y grandes tumores melanocíticos. Véase, Pollock, P.M., et al. (2003), Nat. Genet., 34(1):108-112. Además, inyecciones de células NIH3T3 transformadas con *Gnaq* constitutivamente activo en ratones "nude" atímicos inducen tumores en una semana después de la inyección. Véase, Kaqlinec G., et al. (1992), Mol. Cell Biol., 12(1010):4687-4693.

Se ha indicado que una mutación de *Gnaq* estaba presente en una muestra de melanoma. Esa mutación se describe en el sitio web del Sanger Institute Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC), <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>. Véase, Bamford et al. (2004), Br. J. Cancer, 91:355-358. La mutación (mutación ID nº 182000) descrita en la muestra COSMIC ID nº 753546 (nombre de la muestra CP66-MEL) es una mutación de sustitución de sentido erróneo (1075 G a A) que produce una sustitución de aminoácido conservativa (V359I). No se indica que la mutación de sentido erróneo conservativa V369I de *Gnaq* en CP66-MEL tenga ningún efecto sobre la actividad *Gnaq*.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que subunidades $G\alpha$ activadas que surgen de mutaciones en *Gnaq*, por ejemplo, mutaciones que activan constitutivamente *Gnaq*, están presentes en neoplasmas melanocíticos, por ejemplo, nevi azules, tales como nevi de Ota, nevi azules malignos, un tipo raro de melanoma que surge de un nevus azul (véase, Granter, S.R., et al. (2001), Am. J. Surg. Pathol., 25(3):316-323); melanomas uveales y ciertos melanomas cutáneos, por ejemplo, melanoma lentiginoso maligno o melanomas de la piel dañada por exposición crónica al sol (melanoma CSD).

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos para detectar una célula de melanoma o de nevus en una muestra biológica. Los métodos comprenden detectar una mutación de secuencia activadora en un gen *Gnaq* en una muestra biológica que incluye la célula de melanoma o célula de nevus sospechosa procedente de un paciente. Por ejemplo, la invención proporciona métodos para detectar el melanoma, por ejemplo, melanoma uveal, nevi azules malignos, o melanoma CSD (incluyendo melanoma lentiginoso maligno), mediante la detección de la presencia de una mutación en un gen *Gnaq* o en un producto codificado por el gen; o mediante la detección de la sobreexpresión de *Gnaq*. Los métodos pueden utilizarse para indicaciones de diagnóstico y pronóstico, y para identificar pacientes de melanoma que responden, o que es probable que respondan, a diversas terapias de tratamiento, por ejemplo, antagonistas de G-alfa, o terapias dirigidas a componentes de señalización corriente abajo, tales como inhibidores de proteína quinasa C. La invención también se refiere al tratamiento del melanoma mediante la administración de un inhibidor de *Gnaq* a un paciente que tiene un melanoma, por ejemplo, un melanoma uveal, nevus azul maligno, o melanoma CSD, que surge de una mutación en un gen *Gnaq*.

Así, la invención proporciona un método para detectar una célula de neoplasma melanocítico en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de piel o de ojo, procedente de un paciente, por ejemplo, un paciente que tiene, o que se sospecha que tiene, melanoma, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o la ausencia de una mutación activadora en un gen *Gnaq* en una muestra biológica, en el que la presencia de la mutación es indicativa de la presencia de las células de neoplasma melanocítico en la muestra biológica. En algunas realizaciones, el neoplasma melanocítico es un melanoma uveal, un melanoma que surge sobre la piel con daños inducidos por exposición crónica al sol, por ejemplo, un melanoma lentiginoso maligno, o un melanoma que surge en un nevus, por ejemplo, nevus azul maligno. En otras realizaciones, el neoplasma melanocítico puede ser un melanoma lentiginoso acral, un melanoma mucoso, un melanoma nodular, un melanoma de dispersión superficial, un melanoma desmoplásico, o un melanoma que surge en un nevus congénito, o metástasis. En otras realizaciones, la mutación de *Gnaq* es indicativa de un nevus, tal como un nevus azul, nevus de Ota, un nevus azul atípico, un nevus azul celular atípico, un nevus azul con hamartoma neurocrístico, o un nevus azul sin diagnóstico específico. En otras realizaciones, el nevus puede ser un nevus congénito, o un nevus de penetración profunda. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende detectar la presencia o la ausencia de una mutación de *Gnaq* en un ácido nucleico, por ejemplo, ARNm o ADN genómico. En realizaciones típicas, dichas etapas de detección comprenden una reacción de amplificación, tal como PCR o RT-PCR, hibridación *in situ*, o separación de ácidos nucleicos electroforética (por ejemplo, transferencia Northern o Southern). En otras realizaciones, la etapa de detección comprende detectar la mutación en una proteína *Gnaq*, por ejemplo, midiendo el nivel de actividad y/o expresión de *Gnaq*. En realizaciones típicas, esta etapa de detección comprende el uso de anticuerpos (inmunocitoquímica) y/o separación de proteínas electroforética (por ejemplo, transferencia Western). En algunas realizaciones, la mutación de *Gnaq* es de Gln209 a Leu (CAA a CTA, o CAA a TTA), mientras que en otras realizaciones, la mutación de *Gnaq* es de Gln209 a Pro (CAA a CCA). En algunas realizaciones, la mutación de *Gnaq* es de Gln209 a Arg (CAA a CGA). En otras realizaciones, la mutación de *Gnaq* es de Gln209 a Tyr (CAA a TAT).

5 Generalmente, la etapa de detección comprende la detección de la presencia o la ausencia de una mutación de secuencia en un *Gnaq*. Esto a menudo se consigue, por ejemplo, analizando una muestra de ácido nucleico procedente de la muestra biológica. El ácido nucleico puede ser una muestra de ADN o ARN. La muestra de ADN puede obtenerse a partir de la transcripción inversa de ARN, o puede ser ADN genómico. A menudo, la etapa de detección para detectar la mutación comprende una reacción de amplificación. La presencia o la ausencia de mutaciones puede identificarse, por ejemplo, mediante análisis de la secuencia del ácido nucleico amplificado; o mediante métodos que emplean sondas o cebadores oligonucleotídicos específicos de alelo.

10 En algunas realizaciones, la muestra biológica procede de un paciente que tiene, o que se sospecha que tiene, un melanoma, por ejemplo, un melanoma uveal, un melanoma sobre piel dañada por el sol, o un nevus azul maligno, o metástasis. En otras realizaciones, la muestra biológica procede de un paciente que tiene, o que se sospecha que tiene un nevus, por ejemplo, un nevus azul convencional, un nevus de Ota, un nevus de Ito, una mancha mongoliana, un nevus azul atípico, un nevus azul celular atípico, un nevus azul con hamartoma neurocrístico, un nevus azul sin diagnóstico específico, un nevus congénito, o un nevus de penetración profunda.

15 La invención proporciona un método para controlar el avance de un melanoma en un paciente sometido a terapia, comprendiendo dicho método la detección de un cambio en el número de células que tienen una mutación activadora en un gen *Gnaq* en una muestra biológica procedente de un paciente, en el que un cambio en el número de células que tienen la mutación de *Gnaq* es indicativo de la respuesta del paciente a la terapia.

20 En algunas realizaciones, el control del avance del melanoma en un paciente en el que el melanoma surgió de una mutación en un gen *Gnaq* se realiza mediante la detección de la mutación en un ácido nucleico procedente de la muestra biológica. En otras realizaciones, el avance del melanoma que surge de una mutación en *Gnaq* se detecta mediante la evaluación de una proteína de *Gnaq* presente en la muestra biológica. En algunas realizaciones, la muestra biológica procede del ojo o de la piel. En otras realizaciones, la muestra biológica procede de sangre, nódulo linfático, hígado, glándula adrenal, o hueso.

25 Generalmente, para controlar el avance del melanoma según la invención, la presencia de un número reducido de células que tienen una mutación en *Gnaq* en la muestra biológica tomada de un paciente después del tratamiento con un agente, comparado con el número de células que tienen una mutación de *Gnaq* en una muestra biológica tomada del paciente antes de ser expuesto al agente de tratamiento, es indicativa de una respuesta terapéutica positiva al agente de tratamiento.

30 En todos los métodos de detección de la invención, la muestra biológica puede proceder de cualquier fuente en el cuerpo de la cual se sospecha que contiene células de melanoma primario o metastásico. Así, la muestra biológica puede tomarse de la piel, por ejemplo, piel acral, de piel con daños por exposición crónica al sol, ojo, por ejemplo, úvea, conjuntiva, o membranas mucósicas. En otras realizaciones, la muestra puede proceder de sangre, suero, tejido de nódulos linfáticos, o tejidos de órganos viscerales. En algunas realizaciones, por ejemplo, para controlar el avance del melanoma, la muestra procede de un tejido accesible con facilidad, tal como sangre.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un paciente con melanoma que es candidato a un tratamiento con un inhibidor de *Gnaq*, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o la ausencia de una mutación activadora en un gen *Gnaq* en una muestra biológica procedente de un melanoma presente en el paciente, en el que la presencia de la mutación es indicativa de un paciente con melanoma que es candidato a un tratamiento con un inhibidor de *Gnaq*. La etapa de detección puede comprender la detección de la mutación en ARNm, ADN, o proteínas. En algunas realizaciones, la etapa de detección puede comprender detectar la presencia de una mutación de *Gnaq* en una muestra de ácido nucleico procedente del melanoma o nevus, mientras que en otras realizaciones, la etapa de detección se realiza a partir de una muestra de proteínas procedente de un neoplasma melanocítico. La muestra de ácido nucleico puede ser ARN o ADN, por ejemplo, ADN genómico o ADNc preparado a partir de ARN procedente de la muestra de neoplasma melanocítico. A menudo, la etapa de detección comprende una reacción de amplificación, tal como PCR o RT-PCR.

40 En algunas realizaciones, el melanoma es un melanoma uveal, un nevus azul maligno, un melanoma CSD, por ejemplo, un melanoma lentiginoso maligno, un melanoma acral, un melanoma mucoso, o un melanoma de dispersión superficial. En la presente también se describe un método para determinar si un paciente con melanoma es candidato a recibir una terapia que inhibe la actividad de una subunidad $G\alpha$, directamente o inhibiendo una proteína que es activada por $G\alpha$. El método comprende determinar si las células de melanoma tienen una mutación activadora en *Gnaq*. Esta determinación se realiza según los métodos de detección descritos en la presente.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un antagonista de *Gnaq* para su uso en un método para inhibir la proliferación de células de melanoma que tienen una mutación activadora en *GNAQ* en un paciente que tiene melanoma, en el que el antagonista de *Gnaq* es un inhibidor de proteína quinasa C, un inhibidor de fosfolipasa C β , un anticuerpo contra *Gnaq*, o un inhibidor de ácido nucleico de *Gnaq* que es un ARNm c o un ARN antisentido. Generalmente, las células de los nevi o del melanoma proceden, por ejemplo, de un melanoma uveal, melanoma CSD, por ejemplo, melanoma lentiginoso maligno, melanoma lentiginoso acal, melanoma mucoso, melanoma nodular, melanoma de dispersión superficial, melanoma desmoplásico, melanoma metastásico, o un melanoma que surge en un nevus, por ejemplo, que surge de un nevus azul (un nevus azul maligno), tal como un nevus de Ota, un

nevus de Ito, una mancha mongoliana, un nevus azul atípico, un nevus celular atípico, un nevus azul con hamartoma neurocrístico, un nevus azul sin diagnóstico específico, un nevus azul celular recurrente. Las células de melanoma también puede surgir de un nevus congénito o de un nevus de penetración profunda.

5 La invención también proporciona un método para determinar el riesgo de avance de un nevus hacia un melanoma, comprendiendo dicho método la detección de la presencia o la ausencia de una mutación activadora en un gen *Gnaq* en una muestra biológica procedente del nevus, en el que la presencia de la mutación es indicativa de un mayor riesgo de avance del nevus hacia un melanoma. En algunas realizaciones, la mutación de secuencia es un codón que codifica Gln209 de *Gnaq*. En algunas realizaciones, el nevus es un nevus azul, tal como un nevus de Ota, un nevus azul atípico, un nevus azul celular atípico, un nevus azul con hamartoma neurocrístico, o un nevus azul sin diagnóstico específico. En algunas realizaciones, la mutación se detecta evaluando la proteína que es codificada por el gen.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1a-1c proporciona ejemplos de datos que muestran los efectos de la expresión de GNAQ mutante y de tipo salvaje sobre melanocitos inmortalizados con hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD}. a, GNAQ^{Q209L} induce el crecimiento independiente del anclaje de melanocitos hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD} de una manera independiente de TPA con una eficacia comparable a NAR^{Q61R}. b, Análisis cuantitativo del número y tamaño (mm) de las colonias del experimento mostrado en a. c, Porcentaje de células con núcleos morfológicamente anómalos.

20 La figura 2a-2b proporciona ejemplos de datos que demuestran que GNAQ^{Q209L} induce la activación de MAP quinasa en melanocitos humanos. a, Los melanocitos hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD} expresan unos mayores niveles de pERK y ciclina D1 después de una transfección estable con GNAQ^{Q209L} comparado con GNAQ^{WT}, o sólo con vector; distribución acumulativa de la intensidad de fluorescencia de píxeles media por célula (valores p: GNAQ^{Q209L} frente al vector control. b, Transferencia Western que muestra unos mayores niveles de pER pero no de pAKT en células 293 que expresan GNAQ^{Q209L} marcado, comparado con células transfectadas de GNAQWT o vector control. Se muestra la ciclofilina B como control de carga.

25 La figura 3a-3C muestra la inactivación mediada por ARNm de GNAQ en una línea celular de melanoma uveal, Me1202. a, Se muestra la disminución del nivel de fosfo-ERK en respuesta a ARNm. b, Se muestra la disminución en el número de células en respuesta a ARNm de GNAQ. c, Se muestra un aumento en la apoptosis de las células Me1202, comparado con células control en respuesta a ARNm de GNAQ.

Descripción detallada de la invención

30 Introducción

La presente invención se refiere a la detección de células de cáncer, a usos de pronóstico, y al tratamiento de melanomas y nevi. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que muchos melanomas y nevi surgen de mutaciones somáticas activadoras en *Gnaq*, es decir, mutaciones que producen una pérdida o una disminución de la actividad hidrolizante de GTP de la subunidad G- α mutante. Los ejemplos de neoplasmas melanocíticos que 35 tienen una mutación en *Gnaq* incluyen el melanoma uveal, melanoma CSD (incluyendo melanoma lentiginoso maligno), nevus azul maligno, nevus azul convencional, nevus de Ota, nevus azul atípico, nevus azul celular atípico, nevus azul con hamartoma neurocrístico, y nevus azul sin diagnóstico específico.

G- α es la subunidad alfa de una de las proteínas de unión a GTP heterotriméricas que forman dos subgrupos en vertebrados, la familia G α -q, que es ampliamente expresada y comprende *Gnaq* y *Gan1*, y la familia de *Gna14* y *Gna15*, que muestra una expresión más restringida. La familia G α -q media en la estimulación de la fosfolipasa C β que produce la hidrólisis de bisfosfoinositida (PIP₂) para producir inositida trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). La IP₃ puede estimular la liberación de calcio desde su almacenamiento intracelular en el retículo endoplásmico (RE), que conduce a la señalización dependiente de calcio corriente abajo. En paralelo, DAG puede activar la proteína quinasa C (PKC) y entonces ambas vías pueden pasar a alimentar la cascada de proteína quinasas activada por mitógenos (MAPK). Véase, Corbit, K.C., et al. (2000), *Mol. Cell Biol.*, 20:5392-5403; Sato, M., et al. (2006), *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, 46:151-187.

Los presentes inventores han descubierto que están presentes mutaciones activadoras en *Gnaq*, por ejemplo, mutaciones de sustitución somáticas heterocigóticas de Q209 de *Gnaq*, en varios tipos de neoplasmas melanocíticos, incluyendo nevi, tales como nevi azules convencionales, nevi de Ota, nevi azules atípicos, nevi azules celulares atípicos, nevi azules con hamartoma neurocrístico, y nevi azules sin diagnóstico específico. De manera interesante, no se ha informado previamente de ningún otro gen de melanoma que esté mutado en nevi azules, lo cual sugiere que los nevi azules tienen una etiología exclusiva, comparado con otros nevi. Véase, Ariyanayagam-Baksh, S.M., et al. (2003), *Am. J. Dermatopathol.*, 25(1):21-27. Las mutaciones activadoras, por ejemplo, mutaciones de sustitución somáticas heterocigóticas de Q209 de *Gnaq*, también están presentes en una diversidad de 55 melanomas, incluyendo melanoma uveal, nevus azul maligno, melanomas CSD, y melanoma lentiginoso maligno, un melanoma cutáneo que es el responsable de aproximadamente 4-15% de melanomas cutáneos y tiende a formarse en individuos de edad avanzada en sitios expuestos al sol (véase, Chin, L. (2003), *Nat. Rev. Cancer*, 3(8):559-570).

En algunas realizaciones, una mutación activadora de *Gnaq* es una mutación que conduce a la sobreexpresión de secuencias de ácidos nucleicos y polipeptídicas de *Gnaq*. Así, pueden emplearse métodos que detecten niveles de secuencias de ácidos nucleicos y/o polipeptídicas de *Gnaq* para detectar nevi, por ejemplo, nevi azules, tales como nevi de Ota, y células melanoma, tal como se describe en la presente, en los que se sobreexpresa *Gnaq*.

5 En un aspecto de la invención, la capacidad para detectar nevi y/o células de melanoma mediante la detección de una mutación somática en *Gnaq* que activa *Gnaq* es útil para cualquiera de un gran número de aplicaciones. Por ejemplo, puede utilizarse, por sí sola o en combinación con otros métodos de diagnóstico, para diagnosticar un melanoma, o un cierto tipo de melanoma, en el paciente. También puede utilizarse para identificar melanomas concretos que son sensibles a productos terapéuticos, tales como productos terapéuticos que se dirigen a proteínas
10 G o a fosfolipasa C β , o a otros componentes corriente abajo de las vías reguladas por *Gnaq*.

La detección de mutaciones activadoras somáticas en *Gnaq* también puede utilizarse para controlar la eficacia de un tratamiento del melanoma. Por ejemplo, el nivel de actividad *Gnaq*, por ejemplo, de actividad G α , o de una actividad, tal como fosfolipasa C β , que depende de la actividad G α , o del número de células melanocíticas que tienen una mutación de secuencia en *Gnaq*, después de un tratamiento anticáncer, puede compararse con el nivel antes del
15 tratamiento. Una disminución en el nivel de actividad *Gnaq*, por ejemplo, actividad fosfolipasa C β , o una reducción en el número de células de melanoma que tienen *Gnaq* mutado después del tratamiento, indica un tratamiento eficaz.

El nivel de actividad *Gnaq* y/o un cambio en el número de células que tienen una mutación somática en *Gnaq* también puede correlacionarse estadísticamente con la eficacia de una terapia antimelanoma concreta o con un
20 resultado de pronóstico observado, permitiendo con ello el desarrollo de una base de datos sobre la cual puede realizarse un pronóstico con una base estadística o la selección del tratamiento más eficaz, a la vista de un nivel de actividad concreto o presencia diagnóstica de una mutación de *Gnaq*.

La detección de células que tienen una mutación activadora en *Gnaq* puede ser útil para controlar el número o el emplazamiento de células de melanoma en un paciente, por ejemplo, para controlar el avance del cáncer a lo largo
25 del tiempo.

La presencia de una mutación activadora en *Gnaq* también puede indicar melanomas que pueden responder a agentes terapéuticos que se dirigen a *Gnaq* mutante. Por consiguiente, la invención también se refiere al tratamiento de un neoplasma melanocítico, por ejemplo, melanoma uveal, melanoma lentiginoso maligno, nevus azul maligno, o melanoma en piel con daños por el sol, que tiene una mutación activadora en *Gnaq* mediante la administración de
30 un antagonista de G α , por ejemplo, anticuerpos, péptidos, inhibidores de molécula pequeña, tales como L-treo-dihidroesfingosina (un inhibidor específico de PKC) u otros inhibidores de molécula pequeña, e inhibidores de ácidos nucleicos de *Gnaq*, fosfolipasa C β , o vías corriente abajo reguladas por *Gnaq*. Estos neoplasmas melanocíticos pueden identificarse analizando la presencia de una mutación activadora utilizando los métodos descritos en la presente.

35 La presencia de una mutación activadora en *Gnaq* en nevi a menudo indica nevi, por ejemplo, tipos convencionales de nevi azules y nevi de Ota, que están en riesgo de avanzar hacia un melanoma. Por consiguiente, un nevus de un paciente puede evaluarse para la presencia de una mutación activadora utilizando los métodos descritos en la presente.

Definiciones

40 El término "Gnaq" se refiere a la subunidad alfa de una proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G). El término incluye el ácido nucleico y los polipéptidos, los variantes polimórficos, alelos, mutantes y fragmentos de *Gnaq*. Estas secuencias son muy conocidas en la técnica. Los ejemplos de secuencias de *Gnaq* humanas están disponibles con la referencia de secuencia NM 002072 en la base de datos de nucleótidos NCBI (secuencia de nucleótidos) y el nº de registro NP 002063.2 (secuencia del polipeptido). La secuencia NM_002072 se proporciona
45 en SEQ ID NO:1 como ejemplo de secuencia de nucleótidos. Un ejemplo de secuencia del polipéptido se muestra en SEQ ID NO:2.

Un "melanoma dependiente de *Gnaq*", tal como se emplea en el contexto de esta solicitud, se refiere a un neoplasma melanocítico que comprende células de melanoma que tienen un defecto (también denominado
50 "mutación") en *Gnaq* que activa *Gnaq*, es decir, tienen una mutación "activadora", en comparación con melanocitos que no tienen la mutación, y que conduce a la pérdida o a la disminución de la actividad hidrolizante de GTP de la subunidad G- α mutante. El defecto en *Gnaq* puede implicar una mutación, por ejemplo, una mutación de sustitución, que produce la actividad constitutiva de la proteína. Las "células de melanoma dependiente de *Gnaq*" pueden tener una o más de estas mutaciones, por ejemplo, las células pueden tener una mutación de sustitución somática que implique a Q209. Un "melanoma dependiente de *Gnaq*", tal como se emplea en el contexto de la presente invención,
55 puede surgir, por ejemplo, en sitios de la piel expuestos al sol, en un nevus (por ejemplo, un nevus azul), o en el ojo (por ejemplo, la úvea). Un "melanoma dependiente de *Gnaq*" también puede tener mutaciones en otros genes distintos de *Gnaq*.

En el contexto de esta solicitud, un “melanoma acral” se refiere a un melanoma que aparece en la piel desnuda de las palmas de las manos o las plantas de los pies o bajo las uñas. Un subconjunto de melanomas acrales son los “melanomas lentiginosos acrales”.

5 La expresión “melanoma mucoso” se refiere a tumores que surgen en membranas mucosas; un “melanoma ocular”, tal como se emplea en la presente, es un melanoma que surge en el ojo. Un “melanoma ocular” incluye el melanoma uveal y de la conjuntiva. Un “melanoma de la conjuntiva” se refiere a un melanoma que surge en la conjuntiva, mientras que un “melanoma uveal” se refiere a un melanoma del tracto pigmentado del ojo.

10 Un “melanoma CSD”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un melanoma que surge en la piel con daños inducidos por exposición crónica al sol; y un “melanoma NCSD”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un melanoma que surge en la piel sin daños inducidos por exposición crónica al sol. La distinción entre los grupos “CSD” y “NCSD” en la presente solicitud se basa en una determinación microscópica de la presencia o la ausencia de elastosis solar marcada de la dermis que rodea a los melanomas. En todos los casos excepto en unos cuantos, los melanomas asociados con daños inducidos por exposición crónica al sol (CSD) aparecen en la cara y en las extremidades distales, tales como los antebrazos, parte dorsal de las manos, espinillas de las piernas y pantorrillas. Estos melanomas generalmente aparecen en individuos mayores de 50 años, y microscópicamente tienen un componente intraepidérmico en el que los melanocitos se disponen como unidades solitarias en lugar de conjuntos. Además, estos melanomas tienden a presentar una epidermis atrófica con la difuminación de los rebordes de la red. Un subconjunto de melanomas CSD son los melanomas lentiginosos malignos. Por contraste, los melanomas que no están asociados con daños inducidos por exposición crónica al sol (NCSD) aparecen en el tronco y las extremidades proximales, tales como muslos y parte superior del brazo. Los melanomas NCSD generalmente muestran un componente intraepidérmico en el que los melanocitos están dispuestos en conjuntos en lugar de unidades solitarias, y muestran una considerable dispersión hacia arriba (dispersión pagetoide). Muchos de los melanomas NCSD son melanomas de dispersión superficial.

25 Los daños inducidos por exposición crónica al sol se definen porque presentan una puntuación CSD mayor que CSD 2. Las puntuaciones se obtienen determinando el grado de elastosis solar en secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de la piel normal que rodea los melanomas con un aumento de 100-200x utilizando el siguiente sistema ((Landi et al., Science, 2006), cuyos ejemplos se proporcionan en la figura 1:

CSD 0: ausencia de fibras elastóticas; *CSD0+:* pocas fibras elastóticas discernibles sólo con un aumento 200x;

30 *CSD 1:* fibras elastóticas dispersas presentes como unidades individuales, no como aglomeraciones, entre los haces de colágeno; se emplean los clasificadores “-“ o “+” para indicar que las fibras elastóticas están menos o más densamente dispersas.

35 *CSD 2:* fibras elastóticas densamente dispersas distribuidas predominantemente como aglomeraciones en lugar de unidades individuales; se emplea el clasificador “-“ para indicar que están presentes aglomeraciones pero que predominan las fibras elastóticas distribuidas como unidades individuales, y se emplea el clasificador “+” cuando se forman agregados mayores de las aglomeraciones, pero que conservan el contorno de las aglomeraciones individuales en lugar de formar depósitos amorfos.

CSD 3: depósitos amorfos de material de color azul grisáceo con pérdida de textura de fibras; “-“, sólo formación local de depósitos amorfos, y “+”, aglomerados muy grandes de material basófilo difuso.

40 Tal como se emplea en la presente, la expresión “determinar que el melanoma surge” de un sitio, por ejemplo, piel acral, mucosa, úvea, conjuntiva, o piel con daños inducidos por exposición crónica al sol, se refiere a identificar el sitio de origen de un melanoma. Esta determinación puede realizarse mediante inspección visual de un paciente o mediante una evaluación de la patología del melanoma.

45 Los términos “tumor” o “cáncer” en un animal se refieren a la presencia de células que poseen características tales como un crecimiento o una morfología atípicos, incluyendo proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, tasas de crecimiento y proliferación rápidas, y ciertas características morfológicas. A menudo, las células de cáncer estarán en forma de un tumor, pero estas células pueden existir por sí solas dentro de un animal. Un “tumor” incluye neoplasmas benignos y malignos. El término “neoplásico” se refiere a un crecimiento atípico benigno y maligno.

50 La expresión “neoplasma melanocítico”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un área de hiperpigmentación con relación al tejido circundante. Los neoplasmas melanocíticos incluyen nevi y melanomas primarios, así como melanomas que han metastatizado hacia cualquier lugar del cuerpo. Generalmente, los neoplasmas melanocíticos aparecen en la piel, las membranas mucosas, y el ojo. Los ejemplos no limitantes de neoplasmas melanocíticos pueden incluir melanomas, por ejemplo, melanoma lentiginoso acral, melanoma CSD, melanoma NCSD, melanoma lentiginoso maligno, melanoma mucoso, melanoma nodular, melanoma de dispersión superficial, melanoma desmoplásico, melanoma uveal, melanoma de la conjuntiva, nevi azules celulares recurrentes, melanoma que surge de un nevus congénito, nevus azul maligno, y metástasis. Los neoplasmas melanocíticos, tal como se emplean en la presente, también incluyen los nevi. Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de neoplasmas melanocíticos, tal como se emplean en la presente, pueden incluir nevus congénito, nevus congénito con nódulos,

nevus congénito con reacción desmoplásica, nevus congénito gigante con atipia, nevus congénito gigante con nódulos, nevus congénito sin diagnóstico específico, nevus azul, nevus azul atípico, nevus azul celular atípico, nevus azul con hamartoma neurocrístico, nevus azul sin diagnóstico específico, y nevus de penetración profunda sin diagnóstico específico.

5 La expresión “nevus azul” o “nevi azules”, tal como se emplea en la presente, se refiere a una proliferación melanocítica intradérmica, es decir, dentro de la capa dérmica de la piel, que muestra una mayor pigmentación, de modo que el nevus generalmente tiene un color azulado. Un nevus azul, que puede ser congénito o adquirido, puede presentarse de diversas maneras, que varían de lunares azulados discretos (nevi azules) a grandes parches de color azul grisáceo que afectan a la conjuntiva y a la piel periorbital (nevus de Ota), hombros (nevus de Ito), y zona lumbar (mancha mongoliana).

Una “muestra biológica”, tal como se emplea en la presente, se refiere a una muestra obtenida de un paciente sospechoso de tener o que tiene un melanoma. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una biopsia de tejidos, lo cual se refiere a cualquier tipo de biopsia, tales como una biopsia con aguja, una biopsia con aguja fina, una biopsia quirúrgica, etc. La muestra generalmente comprende una muestra de tejido de la piel que porta el neoplasma o el neoplasma sospechoso, aunque la muestra biológica también puede proceder de otro sitio, por ejemplo, un sitio hacia el cual un melanoma puede metastatizar, o de la sangre. En algunos casos, la muestra biológica también puede proceder de una región adyacente al neoplasma o al neoplasma sospechoso.

“Proporcionar una muestra biológica” significa obtener una muestra biológica para su uso en los métodos descritos en esta invención. De modo más habitual, esto se realiza retirando una muestra de células de un paciente, pero también se puede realizar utilizando células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o para otro objetivo), o realizando los métodos de la invención *in vivo*. También pueden utilizarse tejidos de archivo, con una historia de tratamiento o resultado.

Los términos “idéntico” o porcentaje de “coincidencia”, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o que tienen un porcentaje especificado de restos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, una coincidencia de aproximadamente 60%, preferiblemente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o una coincidencia mayor a lo largo de una región especificada, cuando se comparan y se alinean para la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o una región designada), según se mide utilizando los algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto descritos a continuación, o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase el sitio web de NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ o similares). Entonces se dice que dichas secuencias son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también se refiere o puede aplicarse al complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como las que tienen sustituciones, así como variantes naturales, por ejemplo variantes polimórficos o alélicos, y artificiales. Tal como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden tomar en cuenta los huecos y similares. Preferiblemente, la coincidencia existe a lo largo de una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos, o más preferiblemente a lo largo de una región que tiene una longitud de 50-100 aminoácidos o nucleótidos. Por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que se emplea en la invención puede tener una coincidencia de secuencia de al menos 85%, generalmente del 90% o 95% con una región contigua de SEQ ID NO:1.

40 Para la comparación de las secuencias, generalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, si es necesario se diseñan coordenadas de subsecuencias, y se indican los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Preferiblemente pueden utilizarse los parámetros por defecto del programa, o pueden diseñarse otros parámetros. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula los porcentajes de coincidencia de secuencia para las secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, tal como se emplea en la presente, incluye la referencia a un segmento de una de la serie de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste generalmente de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de haber alineado óptimamente las dos secuencias. Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son muy conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), mediante aplicaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1995, suplemento)).

60 Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de coincidencia de

secuencia y la similitud de secuencia incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nuc. Acids Res., 25:3389-3402 (1977), y Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990). Para los objetivos de esta invención, se emplean BLAST y BLAST 2.0 con los parámetros por defecto para determinar el porcentaje de coincidencia de secuencia para los ácidos nucleicos y las proteínas utilizados en la invención. Los programas informáticos para realizar análisis BLAST están disponibles para el público en the National Center for Biotechnology Information (NCBI). El programa BLAST (para secuencias de nucleótidos) emplea como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, un valor de corte de 100, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos (proteínas), el programa BLAST emplea como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915). Para los objetivos de esta invención, el algoritmo BLAST 2.0 se emplea con los parámetros por defecto y con el filtro desactivado.

Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico presenta reactividad cruzada inmunológica con anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, tal como se describe a continuación. Así, generalmente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos se diferencian sólo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas, tal como se describe a continuación. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que puedan utilizarse los mismos cebadores para amplificar las secuencias.

Los términos "aislado", "purificado" o la expresión "biológicamente puro" se refieren a un material que está sustancial o fundamentalmente exento de los componentes que normalmente le acompañan cuando se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad generalmente se determinan utilizando técnicas de química analítica, tal como una electroforesis en gel de poliacrilamida o una cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína o un ácido nucleico, cuando es la especie predominante presente en una preparación, está sustancialmente purificado. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de algunos de los marcos de lectura abiertos que flanquean al gen en la naturaleza y codifican proteínas distintas de la proteína codificada por el gen. El término "purificado", en algunas realizaciones, indica que un ácido nucleico o una proteína produce fundamentalmente una banda en un gel electroforético. Preferiblemente, significa que el ácido nucleico o la proteína es al menos 85% pura, más preferiblemente al menos 95% pura, y lo más preferiblemente al menos 99% pura. La "pureza" o la "purificación", en otras realizaciones, significa retirar al menos un contaminante de la composición que se va a purificar. En este sentido, una purificación no requiere que el compuesto purificado sea homogéneo, por ejemplo, 100% puro.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de modo intercambiable en la presente para referirse a un polímero de restos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoácidos son un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales, los que contienen restos modificados, y polímeros de aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y a miméticos de aminoácidos que actúan de modo similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que después se modifican, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, por ejemplo, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Estos análogos pueden tener grupo R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que actúan de modo similar a un aminoácido natural.

En la presente los aminoácidos pueden nombrarse mediante sus símbolos de tres letras conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB. De manera similar, los nucleótidos pueden mencionarse mediante sus códigos de una letra comúnmente aceptados.

La expresión "variantes conservativamente modificados" se aplica a secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, los variantes conservativamente modificados se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o fundamentalmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias fundamentalmente idénticas o asociadas, por ejemplo, secuencias contiguas en la naturaleza. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cada posición en que una alanina es especificada por un codón, el codón puede alterarse a otro de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son un tipo de variación conservativamente modificada. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica un polipéptido también describe las variaciones silenciosas del ácido nucleico. Los expertos en la técnica reconocerán

que, en ciertos contextos, cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, a menudo las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de las sondas reales.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, los expertos en la técnica reconocerán que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales en una secuencia de un ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteran, añaden o delecionan un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada es un "variante conservativamente modificado" cuando la alteración produce la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Estos variantes conservativamente modificados son, además y sin exclusión, variantes polimórficos, homólogos interespecíficos, y alelos. Las siguientes son sustituciones típicamente conservativas entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, Creighton, *Proteins* (1984)).

Un "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido" o los equivalentes gramaticales utilizados en la presente, significan al menos dos nucleótidos unidos de modo covalente. Los oligonucleótidos generalmente tienen una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50 o más, hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos y los polinucleótidos son polímeros de cualquier longitud, incluyendo longitudes mayores, por ejemplo, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Un ácido nucleico utilizado en la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener esqueletos alternativos que comprenden, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, u O-metilfosforamidita (véase, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press); y esqueletos y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos. Otros análogos de ácidos nucleicos incluyen los que tienen esqueletos positivos, esqueletos no iónicos, y esqueletos que no son de ribosa, incluyendo los descritos en las patentes de EEUU nº 5.235.033 y 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Sanghui y Cook, eds. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen en una definición de ácidos nucleicos. Pueden realizarse modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato por una diversidad de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y semivida de estas moléculas en entornos fisiológicos o como sondas sobre un biochip. Pueden realizarse mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos; como alternativa, pueden realizarse mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos.

Una diversidad de referencias describe estos análogos de ácidos nucleicos que incluyen, por ejemplo, enlaces fosforamidato (Beaucage et al., *Tetrahedron*, 49(10):1925 (1993) y las referencias citadas allí; Letsinger, *J. Org. Chem.*, 35:3800 (1970); Sprinzl et al., *Eur. J. Biochem.*, 81:579 (1977); Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.*, 14:3487 (1986); Sawai et al., *Chem. Lett.*, 805 (1984); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 110:4470 (1988); y Pauwels et al., *Chemica Scripta*, 26:1419(1986), fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.*, 19:1437 (1991); y patente de EEUU nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 111:2321 (1989)), O-metilfosforoamidita (véase, *Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y enlaces y esqueletos de ácidos nucleicos peptídicos (véase, Egholm, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:1895 (1992); Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.*, 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature*, 365:566 (1993); Carlsson et al., *Nature*, 380:207 (1996)). Otros análogos de ácidos nucleicos incluyen los que tienen esqueletos positivos (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6097 (1995)); esqueletos no iónicos (patentes de EEUU nº 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowski et al., *Angew. Chem. Intl. Ed. English*, 30:423 (1991); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 110:4470 (1988); Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleotide*, 13:1597 (1994); capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.*, 4:395 (1994); Jeffs et al., *J. Biomolecular NMR*, 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.*, 37:743 (1996)) y esqueletos que no son de ribosa, incluyendo los descritos en las patentes de EEUU nº 5.235.033 y 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de una definición de ácidos nucleicos (véase, Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.* (1995), pp. 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls, *C & E News*, 2 de junio, 1997, p. 35.

Otros análogos incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNA), que son análogos de ácidos nucleicos peptídicos. Sus esqueletos son sustancialmente no iónicos bajo condiciones neutras, en contraste con el esqueleto de fosfodiéster, muy cargado, de los ácidos nucleicos naturales. Esto produce dos ventajas. En primer lugar, el esqueleto de PNA muestra una mejor cinética de hibridación. Los PNA presentan cambios mayores en la temperatura de fusión (Tf) para pares de bases desapareadas frente a pares de bases perfectamente apareadas. El ADN y ARN generalmente muestran una disminución de 2-4 °C en la Tf para un desapareamiento interno. Con el esqueleto de PNA no iónico, la disminución se acerca más a 7-9 °C. De manera similar, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación con las bases unidas a estos esqueletos es relativamente insensible a la concentración salina. Además, los PNA no son degradados por enzimas celulares, y así puede ser más estables.

- Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, según se especifica, o contener porciones de secuencia bicatenaria o monocatenaria. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, la descripción de una única hebra también define la secuencia de la hebra complementaria; así, las secuencias descritas en la presente también proporcionan el complemento de la secuencia. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico
- 5 concreta también incluye, de forma implícita, sus variantes conservativamente modificados (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y las secuencias complementarias, así como las secuencias explícitamente indicadas. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto ADN genómico como ADNc, ARN o un híbrido, en el que el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. Un
- 10 "transcrito" generalmente se refiere a un ARN natural, por ejemplo, un pre-ARNm, ARNhn, o ARNm. Tal como se emplea en la presente, el término "nucleósido" incluye nucleótidos y nucleósidos y análogos de nucleótidos, y nucleósidos modificados, tales como nucleósidos amino-modificados. Además, "nucleósido" incluye estructuras de análogos no naturales. Así, por ejemplo, las unidades individuales de un ácido nucleico peptídico, que contienen cada una una base, se denominan en la presente nucleósidos.
- 15 Un "marcador" o "resto detectable" es una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ³²P, tintes fluorescentes, reactivos densos a electrones, enzimas (por ejemplo, tal como se emplean habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas u otras entidades que pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en el péptido o emplearse para detectar anticuerpos específicamente
- 20 reactivos con el péptido. Los marcadores pueden incorporarse en los ácidos nucleicos, las proteínas y los anticuerpos en cualquier posición. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al marcador, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego.
- 25 Un "oligonucleótido o sonda de ácido nucleico marcado" es el que está unido, de modo covalente, a través de un conector o un enlace químico, o de modo no covalente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno, a un marcador, de forma que la presencia de la sonda puede detectarse por la presencia del marcador unido a la sonda. Como alternativa, el método de utilizar interacciones de alta afinidad puede lograr los mismos resultados cuando una pareja de compañeros de unión se unen entre sí, por ejemplo, biotina, estreptavidina.
- 30 Tal como se emplea en la presente, un "oligonucleótido o sonda de ácido nucleico" se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través de apareamiento de bases complementarias, normalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Tal como se emplea en la presente, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C, o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden
- 35 estar unidas mediante un enlace distinto a un enlace fosfodiéster, con la condición de que no interfiera funcionalmente con la hibridación. Así, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes están unidas a través de enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster. Los expertos en la técnica entenderán que las sondas pueden unirse a secuencias diana que no tienen complementariedad completa con la secuencia de la sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas preferiblemente se marcan directamente con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o se marcan indirectamente, tal como con biotina a la cual puede unirse después un complejo de estreptavidina. Ensayando la presencia o la ausencia de la sonda se puede detectar la presencia o la ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada. El diagnóstico o pronóstico puede estar basado en el nivel genómico, o en el nivel de expresión de ARN o proteína.
- 40 El término "recombinante", cuando se utiliza haciendo referencia, por ejemplo, a una célula o a un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector ha sido modificado mediante la introducción de una proteína o un ácido nucleico heterólogo, o la alteración de una proteína o un ácido nucleico nativo, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta forma. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes
- 45 nativos que de otra forma son expresados de modo anómalo, infraexpresados o no expresados. La expresión "ácido nucleico recombinante" en la presente significa un ácido nucleico, originariamente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación del ácido nucleico, por ejemplo, utilizando polimerasas y endonucleasas, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. De modo similar, una "proteína recombinante" es una proteína preparada utilizando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante
- 50 como se indica anteriormente.
- 55 La expresión "se hibrida de modo selectivo (o específico) con" se refiere a la unión, la formación de dúplex, o la hibridación de una molécula con una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones de hibridación rigurosas cuando esta secuencia está presente en una mezcla (por ejemplo, ADN o ARN celular total o de bancos, una reacción de amplificación), de modo que la unión de la molécula a la secuencia de nucleótidos particular es
- 60 determinativa de la presencia de la secuencia de nucleótidos en la mezcla.
- La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará

con su subsecuencia diana, generalmente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan de modo específico a temperaturas más altas. Una guía exhaustiva para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajo que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_f es la temperatura (bajo una concentración de ácidos nucleicos, fuerza iónica y pH definidos) en la que 50% de las sondas complementarias con la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (puesto que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_f, 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina sea menor que aproximadamente 1,0 M de ion sodio, generalmente una concentración de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura será al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden alcanzarse con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la hibridación de fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación de fondo. Los ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas pueden ser los siguientes: formamida al 50%, 5x SSC, y SDS al 1%, incubación a 42 °C, o 5x SSC, SDS al 1%, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1% a 65 °C. Para la PCR, una temperatura de aproximadamente 36 °C es típica para una amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32 °C y 48 °C dependiendo de la longitud del cebador. Para una amplificación con PCR de alta rigurosidad, una temperatura de aproximadamente 62 °C es típica, aunque las temperatura de hibridación de alta rigurosidad pueden variar de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, dependiendo de la especificidad y la longitud del cebador. Unas condiciones de ciclo típicas para amplificaciones de alta y baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización a 90 °C-95 °C durante 30 sg-2 min, una fase de hibridación que dura 30 sg-2 min, y una fase de extensión a aproximadamente 72 °C durante 1-2 min. Los protocolos y las líneas directrices para reacciones de amplificación de baja y alta rigurosidad se proporcionan, por ejemplo, en Innis et al. (1990), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.).

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea utilizando la máxima degeneración del código permitida por el código genético. En estos casos, los ácidos nucleicos generalmente se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Los ejemplos de "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37 °C, y un lavado en 1x SSC a 45 °C. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad que pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similar. Otras líneas directrices para determinar los parámetros de hibridación se proporcionan en numerosas referencias, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, et al.

La expresión "efectos funcionales" en el contexto de los ensayos para ensayar compuestos que inhiben la actividad de una proteína de Gnaq incluye la determinación de un parámetro que está indirecta o directamente bajo la influencia de la proteína o del ácido nucleico de Gnaq, por ejemplo, un efecto funcional, físico o químico, tal como la capacidad para disminuir la tumorigénesis, o para alterar la actividad GTP hidrolasa. Las actividades o los efectos funcionales de Gnaq pueden incluir una actividad de interacción proteína-proteína, por ejemplo, la capacidad de Gnaq de unirse a un anticuerpo o a otra proteína con la que interacciona; una actividad GTP hidrolasa, la capacidad de Gnaq de unirse a GTP y/o GDP; inhibición por contacto y limitación de la densidad de crecimiento; la proliferación celular; la transformación celular; cambios en la pigmentación; dependencia de un factor del crecimiento o del suero; niveles de marcadores específicos de tumores; invasividad hacia Matrigel; crecimiento tumoral y metástasis *in vivo*, incluyendo al medición del crecimiento tumoral y "captación" del tumor en un sistema de modelo; expresión de ARNm y proteínas en células, incluyendo las que sufren metástasis, y otras características de las células de cáncer. Los "efectos funcionales" incluyen actividades *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

Tal como se emplea en la presente, los "inhibidores" o "antagonistas" de Gnaq (por ejemplo, "antagonistas de Gnaq") se refieren a moléculas o compuestos moduladores que, por ejemplo, se unen, bloquean parcial o totalmente la actividad, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o infrarregulan la actividad o la expresión de una proteína de Gnaq, fosfolipasa C β , o moléculas corriente abajo reguladas por Gnaq, por ejemplo, proteína quinasa C (PKC). Los inhibidores pueden incluir ARNm o ARN antisentido, versiones genéticamente modificadas de la proteína de Gnaq, por ejemplo, versiones con actividad alterada, así como antagonistas de Gnaq naturales y sintéticos, anticuerpos, moléculas químicas pequeñas y similares. Los inhibidores de Gnaq para su uso son conocidos en la invención. Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de inhibidores adecuados para su uso con la presente invención pueden incluir inhibidores de PKC, por ejemplo, el inhibidor de PKC relativamente no específico estaurosporina, el análogo de estaurosporina CPG41251, briostatina-1, KAI-9803, 7-hidroxiestaurosporina, L-treo-dihidroesfingosina (safingol), el inhibidor de PKC no selectivo PKC412, ilmofosina (BM 41 440), indolcarbazol Gö6796 que es un inhibidor más específico de las isoformas de PKC clásicas, incluyendo PKC μ , el inhibidor antisentido de PKC-alfa LY900003, y los inhibidores de PKC-beta LY333531, LY317615 (enzastaurina). Un ejemplo

de molécula antisentido adecuada para su uso para disminuir el ARN de PKC-alfa es 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'. Los ejemplos no limitantes de fosfolipasa C β pueden incluir edelfosina y fluvirusina B[2]. Los ensayos para identificar otros inhibidores pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en células, o membranas celulares, aplicando los compuestos inhibidores de ensayo, y después determinando los efectos funcionales sobre la actividad.

En algunas realizaciones, las muestras o los ensayos que comprenden proteínas de Gnaq que son tratadas con un inhibidor potencial se comparan con muestras control sin el inhibidor para estudiar el efecto sobre la actividad. Generalmente, a muestras control, por ejemplo, células de melanoma, que tienen una mutación en Gnaq y que no son tratadas con inhibidores se les asigna un valor de actividad de proteínas relativa del 100%. La inhibición de Gnaq se logra cuando el valor de actividad con relación al control cambia en al menos 20%, preferiblemente 50%, más preferiblemente 75-100% o más. En algunas realizaciones, un inhibidor activará una actividad concreta, tal como la hidrólisis de GTP, pero sin embargo el efecto neto será una disminución en la actividad de Gnaq, por ejemplo, en comparación con controles que tienen Gnaq activado.

La expresión "cambios en el crecimiento celular" se refiere a cualquier cambio en las características de crecimiento y proliferación celular *in vitro* o *in vivo*, tales como la formación de focos, independencia del anclaje, crecimiento en agar blando o semisólido, cambios en la inhibición por contacto y limitación de la densidad de crecimiento, pérdida de los requerimientos de factores del crecimiento o de suero, cambios en la morfología celular, ganancia o pérdida de inmortalidad, ganancia o pérdida de marcadores específicos de tumores, capacidad para formar o suprimir tumores cuando se inyectan en hospedantes animales adecuados y/o inmortalización de la célula. Véase, Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique, pp. 231-241 (3ª ed., 1994).

Tal como se emplea en la presente, un "anticuerpo" incluye la referencia a una molécula de inmunoglobulina que es inmunológicamente reactiva con un antígeno concreto, e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. El término también incluye formas genéticamente modificadas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). El término "anticuerpo" también incluye las formas de unión al antígeno de los anticuerpos, incluyendo los fragmentos con capacidad de unión al antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rlgG). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Véase también, por ejemplo, Kuby, J., Immunology, 3ª ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también se refiere a fragmentos Fv monocatenarios recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas biespecíficas o bivalentes, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen, por ejemplo, en Kostelny et al., (1992), J. Immunol., 148:1547; Pack y Pluckthun (1992), Biochemistry, 31:1579; Hollinger et al., 1993, supra; Gruber et al. (1994), J. Immunol., 5368; Zhu et al. (1997), Protein Sci., 6:781; Hu et al. (1996), Cancer Res., 56:3055; Adams et al. (1993), Cancer Res., 53:4026; y McCartney, et al. (1995), Protein Eng., 8:301.

Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno concreto puede generarse mediante métodos recombinantes, tales como la selección de bancos de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o vectores similares. Véase, por ejemplo, Huse et al., Science, 246:1275-1281 (1989); Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989); y Vaughan et al., Nature Biotech., 14:309-314 (1996), o inmunizando un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno.

Generalmente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y una cadena ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como "dominios"). Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen cuatro regiones de marco interrumpidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR).

Las referencias a "V_H" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv, o Fab. Las referencias a "V_L" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, o Fab.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de inmunoglobulina en la que (a) la región constante, o cualquiera de sus porciones, está alterada, reemplazada o intercambiada de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o a una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor del crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o cualquiera de sus porciones, está alterada, reemplazada o intercambiada por una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Un "anticuerpo humanizado" es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, un rata o un conejo, que tengan la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de marco o CDR importadas. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y

5 generalmente dos dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de marco (FR) son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también contendrá, de modo óptimo, al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)). La humanización puede realizarse fundamentalmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedores por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EEUU nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana.

15 La expresión "anticuerpo totalmente humano" se refiere a una inmunoglobulina que comprende regiones hipervariables humanas además de regiones de marco y constantes humanas. Estos anticuerpos pueden producirse utilizando diversas técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, los métodos *in vitro* implican el uso de banco recombinantes de fragmentos de anticuerpos humanos presentados sobre bacteriófagos (por ejemplo, McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:58 (1991)), células de levadura (Boder y Wittrup, 1997, Nat. Biotechnol., 15:553-557), o ribosomas (Hanes y Pluckthun, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942). De modo similar, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulinas endógenos han sido parcial o totalmente inactivados. Tras la exposición se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 6.150.584; 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 25 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: por ejemplo, Jakobavits, Adv. Drug Deliv. Rev., 31:33-42 (1998); Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995).

30 Un "epitopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epitopos pueden formarse con aminoácidos contiguos o con aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epitopos formados con aminoácidos contiguos generalmente se mantienen tras la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epitopos formados por el plegamiento terciario generalmente se pierden tras un tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epitopo generalmente incluye al menos 3, y de modo más habitual al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial exclusiva. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epitopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, Glenn E. Morris, ed. (1996).

Métodos recombinantes generales

40 Esta invención se basa en parte en técnicas habituales en el campo de la genética recombinante, por ejemplo, para los métodos utilizados para detectar Gnaq o para la preparación de un polipéptido de Gnaq que pueda utilizarse en ensayos, tales como ensayos de selección. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed., 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994-1999). Por ejemplo, en aplicaciones en las que se va a producir Gnaq, o cualquiera de sus fragmentos, por ejemplo, para su uso en un ensayo para detectar inhibidores, se emplean protocolos de expresión habituales.

Identificación de una secuencia Gnaq en una muestra procedente de un paciente

50 En un aspecto de la invención, la presencia de una mutación activadora en un polinucleótido de Gnaq, por ejemplo, ARNm o ADN genómico, o una mayor actividad de una proteína de Gnaq y/o la presencia de una mutación de secuencia en la proteína de Gnaq, se determina en muestras biológicas sospechosas de comprender células de nevus y/o melanoma.

En algunas realizaciones, se determinan las mutaciones activadoras en los ácidos nucleicos de Gnaq. Tal como se ha indicado, las secuencias de Gnaq humanas son muy conocidas. El gen Gnaq se cartografía hasta 9q21 y el transcrito de ARNm tiene 2,188 kb, y codifica una proteína de 359 aminoácidos.

55 Una "mutación de secuencia", tal como se emplea en esta solicitud, se refiere a cambios en la secuencia polinucleotídica que producen cambios en la actividad de la proteína. Las mutaciones pueden ser sustituciones de nucleótidos, tales como sustituciones de un solo nucleótido, inserciones o deleciones. Las mutaciones de Gnaq en neoplasmas melanocíticos de la presente invención generalmente son mutaciones activadoras que conducen a la activación constitutiva de la actividad Gnaq. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que la actividad constitutiva surge de una falta de actividad GTP-hidrolasa en la proteína de Gnaq mutante.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de mutaciones activadoras somáticas heterocigóticas presentes en Gnaq en neoplasmas melanocíticos, por ejemplo, nevus azul, nevus de Ota, nevus azul maligno, melanoma uveal, y melanomas CSD (por ejemplo, melanoma lentiginoso maligno). Una mutación puede estar en cualquier parte del gen Gnaq, y la mutación conduce a la activación de Gnaq. Un sitio de mutación de secuencia habitual está presente en Q209. Los ejemplos de mutaciones que pueden indentificarse en la presente invención se muestran en la tabla 2. Estas mutaciones incluyen de CAA a CTA, y de CAA a TTA (ambas producen una sustitución Q209L), de CAA a CCA que produce una sustitución Q209P, de CAA a CGA que produce una sustitución Q209R, y de CAA a TAT que produce una sustitución Q209Y. Tal como se entiende en la técnica, la mutación concreta habitualmente se designa mediante el cambio en la secuencia de aminoácidos que surge debido a la mutación en la secuencia del ácido nucleico.

En la presente invención, se detecta un nivel alterado de actividad Gnaq y/o una mutación en la secuencia de Gnaq para el diagnóstico (o para indicaciones de pronóstico) de neoplasmas melanocíticos, por ejemplo, para el diagnóstico de subtipos de melanoma, tales como melanoma uveal, acral, CSD, y nevus azul maligno, así como nevus azul benigno y nevus de Ota. Así, las muestras biológicas obtenidas de pacientes que tienen o que se sospecha que tienen un neoplasma melanocítico pueden analizarse para mutaciones en la secuencia del ARNm o de la proteína de Gnaq. La presencia de una mutación se analiza de modo conveniente utilizando muestras de ARN, ADN, o proteínas.

Detección de mutaciones de secuencia en Gnaq

En una realización, la detección de diagnóstico y pronóstico de una mutación de secuencia en Gnaq se realiza determinando el número de células en una muestra biológica que tienen una mutación de secuencia en Gnaq. Los métodos para evaluar la secuencia de un gen concreto son muy conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, entre otros, ensayos basados en la hibridación y la amplificación. Una mutación de secuencia en Gnaq en la presente invención puede determinarse utilizando una sonda que se hibrida de modo selectivo con la secuencia mutante.

En algunas realizaciones, una mutación de secuencia en Gnaq es una muestra biológica se determina mediante una hibridación *in situ*, por ejemplo, una hibridación *in situ* de fluorescencia. Los ensayos de hibridación *in situ* son muy conocidos (por ejemplo, Angerer (1987), Meth. Enzymol., 152:649). Las sondas utilizadas en estas aplicaciones se hibridan de modo específico con la región de la secuencia de Gnaq que porta la mutación. Las sondas preferidas son lo suficientemente largas, por ejemplo de aproximadamente 10, 15 o 20 nucleótidos a aproximadamente 50 o más nucleótidos, para hibridarse de modo específico con el ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana bajo condiciones rigurosas.

Puede utilizarse cualquiera de una serie de otros ensayos basados en la hibridación para detectar una mutación de secuencia en Gnaq en las células de una muestra biológica. Por ejemplo, pueden emplearse transferencias por puntos, ensayos basados en matrices y similares para determinar las mutaciones de secuencia en Gnaq.

En algunas realizaciones, se emplean ensayos basados en la amplificación para detectar mutaciones de secuencia en Gnaq o para medir los niveles del transcrito de Gnaq. En estos ensayos, la secuencia de ácido nucleico de Gnaq actúa como molde en una reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de polimerasa o PCR). Los ejemplos de ensayos basados en la amplificación pueden incluir métodos de RT-PCR muy conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., *supra*). Los protocolos detallados para la PCR de ADN y ARN, incluyendo métodos de amplificación cuantitativos, son conocidos (véase, por ejemplo, Innis et al. (1990), PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.; y Ausubel, y Russell y Sambrook, ambos *supra*). Las secuencias de ácidos nucleicos conocidas para Gnaq (véase, por ejemplo, SEQ ID NO:1) son suficientes para permitir a los expertos en la técnica seleccionar de modo habitual cebadores para amplificar cualquier porción del gen. Pueden diseñarse cebadores adecuados para la amplificación de secuencias específicas utilizando principios muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dieffenbach y Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual (1995)).

Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, Wu y Wallace (1989), Genomics 4:560, Landegren et al. (1988), Science, 241:1077; y Barringer et al. (1990), Gene, 89: 117), la amplificación de transcripción (Kwoh et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173), la replicación de secuencias autónoma (Guatelli et al. (1990), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87:1874), PCR de puntos, y PCR de adaptador conector, etc.

La presencia de mutaciones en secuencias de ADN o ARN de Gnaq puede determinarse utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, en una realización, puede emplearse la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo, que se basa en distinguir un mutante de una secuencia de ácido nucleico normal utilizando un oligonucleótido que se hibrida de modo específico con el mutante o la secuencia de ácido nucleico normal. Este método generalmente emplea oligonucleótidos cortos, por ejemplo, con una longitud de 15-20 nucleótidos, que se diseñan para hibridarse de modo diferencial con el alelo normal o mutante. Las guías para diseñar estas sondas están disponibles en la técnica. La presencia de un alelo mutante se determina midiendo la cantidad de oligonucleótido específico de alelo que se hibrida con la muestra.

Los formatos de ensayos adecuados para detectar híbridos formados entre sondas y secuencias de ácidos nucleicos diana en una muestra son conocidos en la técnica e incluyen el formato de diana inmovilizada (transferencia por puntos) y los formatos de ensayos de sonda inmovilizada (transferencia por puntos inversa o transferencia en línea).

Los formatos de ensayo de transferencia por puntos y de transferencia por puntos inversa se describen en las patentes de EEUU nº 5.310.893; 5.451.512; 5.468.613; y 5.604.099.

5 En otras realizaciones, la presencia (o la cantidad) de un ácido nucleico de Gnaq normal o mutante puede detectarse utilizando métodos de amplificación específica de alelo o de extensión de cebadores. Estas reacciones generalmente implican el uso de cebadores que se diseñan para dirigirse de modo específico a un alelo normal o mutante a través de un desapareamiento en el extremo 3' de un cebador. La presencia de un desapareamiento afecta a la capacidad de una polimerasa para extender un cebador cuando la polimerasa carece de actividad correctora de errores. La cantidad de producto amplificado puede determinarse utilizando una sonda o midiendo directamente la cantidad de ADN presente en la reacción.

10 La detección de los niveles de ácidos nucleicos de Gnaq, por ejemplo, los niveles de polinucleótidos de Gnaq normales y/o mutantes, o de la presencia de una mutación de Gnaq, también puede realizarse utilizando un ensayo cuantitativo, tal como una actividad 5'-nucleasa (también denominado ensayo "TaqMan®"), por ejemplo, según se describe en las patentes de EEUU nº 5.210.015; 5.487.972; y 5.804.375; y Holland et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7276-7280. En este ensayo, durante la reacción de amplificación se añaden sondas de detección marcadas que se hibridan dentro de la región amplificada. En algunas realizaciones, la sonda de hibridación puede ser una sonda específica de alelo que discrimina entre un alelo normal o mutante. Como alternativa, el método puede utilizarse utilizando un cebador específico de alelo y una sonda marcada que se une a un producto amplificado. En otras realizaciones, la sonda puede no discriminar entre un alelo normal y mutante.

20 En otras realizaciones, la presencia de un alelo de Gnaq mutante puede determinarse de modo conveniente utilizando secuenciación de ADN, tal como pirosecuenciación u otras técnicas de secuenciación conocidas. Otros métodos de detección incluyen métodos de detección de polimorfismo conformacional monocatenario o de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción, y análisis de electroforesis en gel en gradiente desnaturizante.

25 Tal como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones se detectan niveles de ARN de Gnaq. Los métodos para detectar y/o cuantificar el nivel de transcritos del gen Gnaq (ARNm o ADNc fabricado a partir de éste) utilizando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los niveles de expresión de Gnaq también pueden analizarse mediante técnicas, tales como RT-PCR, por ejemplo, utilizando RT-PCR a tiempo real empleando cebadores o sondas específicos de alelos, transferencia por puntos, hibridación *in situ*, protección de ARNasa, ensayos de micromatrices de ADN con sondas, y similares.

30 La sobreexpresión de Gnaq, tanto de secuencias mutadas como de secuencias de polipéptidos y/o de ácidos nucleicos normales, puede detectarse, por ejemplo, utilizando secuencias cuantitativas conocidas en la técnica, tales como las que se describieron anteriormente en la presente. La sobreexpresión se determina con referencia a un control, por ejemplo, un tejido normal o melanocitos normales.

Detección de secuencias de polipéptidos de Gnaq

35 La expresión y/o la actividad alteradas de Gnaq también puede detectarse mediante la detección de la actividad o la proteína de Gnaq. Por ejemplo, la detección de la actividad de la proteína de Gnaq o de la presencia de proteínas de Gnaq que tienen una mutación puede emplearse para objetivos de diagnóstico o en ensayos de selección. En algunas realizaciones, el nivel de Gnaq o la presencia de un polipéptido de Gnaq normal o mutante en una muestra se determina de modo conveniente utilizando ensayos inmunológicos. En otras realizaciones, la actividad de Gnaq puede utilizarse para determinar la presencia de una mutación activadora de Gnaq en una muestra biológica. La siguiente sección analiza la detección inmunológica de Gnaq. La sección también se refiere a la generación y la modificación de anticuerpos que pueden utilizarse, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas.

Detección inmunológica de Gnaq

45 Pueden emplearse anticuerpos para detectar Gnaq o pueden evaluarse en los métodos de la invención para la capacidad para inhibir a Gnaq. La detección y/o la cuantificación de Gnaq puede lograrse utilizando cualquiera de una serie de ensayos de unión inmunológica bien reconocidos. Una visión general de la tecnología aplicable puede encontrarse en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988); y Harlow y Lane, *Using Antibodies* (1999). Otras fuentes también incluyen *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed., 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites y Terr, eds., 7ª ed. 1991); y *Current Protocols in Immunology* (Coligan, et al., eds., John C. Wiley, 1999-presente). Los ensayos de unión inmunológica pueden emplear anticuerpos policlonales o monoclonales. En algunas realizaciones, pueden emplearse anticuerpos que detectan de modo específico moléculas de Gnaq mutantes.

55 Los ensayos que se utilizan habitualmente incluyen ensayos no competitivos (por ejemplo, ensayos de "sandwich") y ensayos competitivos. En los ensayos competitivos, la cantidad de Gnaq presente en la muestra se mide de modo indirecto midiendo la cantidad de un Gnaq conocido añadido (exógeno) desplazado (por competencia) de un anticuerpo anti-Gnaq por el Gnaq desconocido presente en una muestra. Los formatos de ensayo que se emplean habitualmente incluyen inmunotransferencias, que se emplean para detectar y cuantificar la presencia de proteínas en una muestra. Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que emplean liposomas

diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberar marcadores o reactivos encapsulados, que entonces se detectan según técnicas convencionales (véase, Monroe et al., Amer. Clin. Prod. Rev., 5:34-41 (1986)).

5 Los inmunoensayos a menudo también utilizan un agente marcador para unirse de modo específico y marcar el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente marcador puede ser en sí mismo uno de los restos que forman el complejo anticuerpo/antígeno. Así, el agente marcador puede ser un polipéptido de Gnaq marcado o un anticuerpo anti-Gnaq marcado. Como alternativa, el agente marcador puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo secundario, que se une de modo específico con el complejo de anticuerpo/antígeno (un anticuerpo secundario generalmente es específico para anticuerpos de la especie de la cual se deriva el primer anticuerpo).
10 Otras proteínas capaces de unirse de modo específico a regiones constantes de inmunoglobulinas, tales como la proteína A o la proteína G, también pueden emplearse como agente marcador. El agente marcador puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, al cual puede unirse de modo específico otra molécula, tal como estreptavidina. Los expertos en la técnica conocen una diversidad de restos detectables.

15 El grupo detectable o marcador concreto utilizado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, con la condición de que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo utilizado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Estos marcadores detectables han sido bien desarrollados en el campo de los inmunoensayos y, en general, casi cualquier marcador útil en dichos métodos puede aplicarse a la presente invención. Así, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos,
20 ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen esferas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS™), compuestos fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, fluoresceína y similares), radiomarcadores, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otras que se emplean habitualmente en ELISA), estreptavidina/biotina, y marcadores colorimétricos, tales como oro coloidal o esferas de vidrio o de plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). También pueden utilizarse compuestos quimioluminiscentes. Para un informe de los diversos sistemas de marcaje o productores de señales que pueden utilizarse, véase la patente de EEUU nº 4.391.904.

25 Los anticuerpos contra Gnaq están disponibles en el mercado (véase, Genesis Biotech, Inc., Taipei County, Taiwan). En algunas realizaciones, las mutaciones en Gnaq pueden detectarse utilizando anticuerpos que se unen de modo específico a una forma mutante, y así los inmunoensayos también pueden utilizarse para detectar proteínas de Gnaq mutantes.
30

Puede utilizarse Gnaq, o cualquiera de sus fragmentos, por ejemplo, la porción del péptido que contiene con frecuencia una mutación de secuencia, para producir anticuerpos específicamente reactivos con Gnaq. Por ejemplo, se aísla un Gnaq recombinante, o cualquiera de sus fragmentos antigénicos. La proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Como alternativa, un péptido sintético derivado de las secuencias descritas en la presente y conjugado con una proteína portadora puede utilizarse como inmunógeno. También puede utilizarse una proteína natural en forma pura o impura. El producto entonces se utiliza para generar anticuerpos.
35

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales y policlonales que reaccionan de modo específico con Gnaq son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Coligan; Harlow y Lane, ambos *supra*). Estas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos a partir de bancos de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante la inmunización de conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse et al., Science, 246:1275-1281 (1989); Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989)). Estos anticuerpos pueden utilizarse para aplicaciones de diagnóstico o pronóstico, por ejemplo, para la detección de melanomas o para otros cánceres que muestran una actividad o expresión aumentada de Gnaq.
40
45

Generalmente, se seleccionan antisueros policlonales con una titulación de 10^4 o mayor y se ensayan para la reactividad cruzada contra proteínas que no son de Gnaq o incluso con otras proteínas relacionadas de otros organismos, utilizando un inmunoensayo de unión competitiva. Los antisueros policlonales y los anticuerpos monoclonales específicos generalmente se unen con una Kd de al menos aproximadamente 0,1 mM, de modo más habitual de al menos aproximadamente 1 μ M, opcionalmente al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y opcionalmente 0,01 μ M o mejor.
50

En algunas realizaciones, puede utilizarse un anticuerpo de Gnaq para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, este anticuerpo puede utilizarse para reducir o eliminar una función biológica de Gnaq según se describe a continuación. Es decir, la adición de anticuerpos anti-Gnaq (policlonales o preferiblemente monoclonales) a un neoplasma melanocítico (o a una población celular que contiene células cancerosas) puede reducir o eliminar el neoplasma. En general, se prefiere una disminución de al menos 25% en la actividad, crecimiento, tamaño o similares, siendo particularmente preferido al menos aproximadamente 50%, y siendo especialmente preferida una disminución de aproximadamente 95-100%.
55

A menudo, los anticuerpos contra las proteínas de Gnaq para aplicaciones terapéuticas son anticuerpos

humanizados (por ejemplo, Xenerex Biosciences, Mederex, Inc., Abgenix, Inc., Protein Design Labs, Inc.). También pueden producirse anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bancos de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p. 77 (1985); y Boerner et al., J. Immunol., 14, 7(1):86-95 (1991)). De modo similar, pueden fabricarse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulinas endógenos ha sido parcial o totalmente inactivados. Tras la exposición se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995).

15 Detección de actividad

Tal como aprecian los expertos en la técnica, la actividad Gnaq puede detectarse para evaluar los niveles de expresión o para identificar inhibidores de la actividad. La actividad puede evaluarse utilizando una diversidad de ensayos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo la actividad de unión a GTP y GDP, la actividad GTP-hidrolasa, o la medición de la fosfolipasa C β . En algunas realizaciones, la actividad Gnaq puede evaluarse utilizando criterios de valoración adicionales, tales como los asociados con la transformación o la pigmentación. Estos ensayos se describen con más detalle en los ejemplos y la sección que detalla los métodos para identificar otros inhibidores de Gnaq. Generalmente, la actividad Gnaq se determina midiendo la capacidad de unirse a una proteína con la que interacciona, por ejemplo, un anticuerpo, un ligando u otra proteína, tal como moléculas de señalización.

Diagnóstico/prognóstico de enfermedades

25 Las secuencias de ácidos nucleicos y de polipéptidos de Gnaq pueden utilizarse para el diagnóstico o el pronóstico de un neoplasma melanocítico en un paciente. Por ejemplo, tal como se describió anteriormente, puede determinarse la secuencia, el nivel o la actividad de Gnaq en una muestra de neoplasma melanocítico procedente de un paciente, en la que una alteración, por ejemplo, un aumento en el nivel de expresión o actividad de Gnaq o una mutación de secuencia en Gnaq, indica la presencia o la probabilidad de un neoplasma melanocítico.

30 Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para determinar el curso de tratamiento óptimo en un paciente con cáncer. Por ejemplo, la presencia de una mutación de secuencia en Gnaq puede indicar que ciertos productos terapéuticos, tales como los que se dirigen a Gnaq, fosfolipasa C β , o vías corriente abajo reguladas por Gnaq, serán beneficiosos para esos pacientes. Además, puede establecerse con facilidad una correlación entre la presencia de un defecto o de una mutación de secuencia en Gnaq, y la eficacia relativa de uno u otro agente antimelanoma. Estos análisis pueden realizarse, por ejemplo, retrospectivamente, es decir, analizando para un defecto o una mutación de secuencia en Gnaq muestras tomadas previamente de pacientes que posteriormente se han sometido a uno o más tipos de terapias anticáncer, por ejemplo, terapias que se dirigen a proteínas G o fosfolipasa C β , o a otras vías corriente abajo reguladas por Gnaq, y correlacionando la presencia del defecto con la eficacia conocida del tratamiento.

40 A menudo, estos métodos se emplearán junto con otros métodos de diagnóstico, por ejemplo, la detección de otros indicadores de melanoma, por ejemplo, morfología celular, y similares. En otras realizaciones, una muestra de tejido de la cual se sabe que contiene células de melanoma, por ejemplo, procedente de un tumor, se analizará para defectos en Gnaq para determinar cierta información acerca del cáncer, por ejemplo, la eficacia de ciertos tratamientos, tales como productos terapéuticos que se dirigen a Gnaq, o vías corriente abajo reguladas por Gnaq.

45 En algunas realizaciones, el análisis de células de melanoma para la presencia de defectos o mutaciones de secuencia en Gnaq puede utilizarse para determinar el pronóstico de un paciente con melanoma o para determinar el avance de la enfermedad. Una "presencia de diagnóstico" puede ser unos mayores niveles de ARNm o proteínas y/o actividad Gnaq y/o la presencia de mutaciones de secuencia en Gnaq que alteran la función.

50 Cualquier muestra biológica sospechosa de contener células de melanoma puede evaluarse para determinar el avance. Por ejemplo, tejidos de órganos viscerales, sangre, nódulos linfáticos y similares puede analizarse para la presencia de mutaciones de secuencia en Gnaq y/o mayores niveles de actividad Gnaq.

Selección de inhibidores o moduladores de Gnaq

55 En otro aspecto, la invención incluye tratar un melanoma que sobreexpresa y/o que tiene una mutación en Gnaq, en el que el tratamiento comprende administrar un inhibidor o antagonista de Gnaq. Los inhibidores y antagonistas de Gnaq son conocidos. Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de inhibidores adecuados para su uso con la presente invención pueden incluir inhibidores específicos y no específicos de PKC y diversas isoformas de PKC, incluyendo PKC μ y PKC ϵ . Los ejemplos no limitantes de inhibidores adecuados para su uso con la presente invención incluyen

estaurosporina, el análogo de estaurosporina CPG41251, briostatina-1, KAI-9803, 7-hidroxiestaurosporina, L-treo-dihidroesfingosina (safingol), el inhibidor de PKC no selectivo PKC412, ilmofosina (BM 41 440), Gö6796 que es un indolcarbazol que inhibe de modo más específico las isoformas clásicas de PKC, incluyendo PKC μ , el inhibidor antisentido de PKC-alfa LY900003, y los inhibidores de PKC-beta LY333531, LY317615 (enzastaurina). Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la fosfolipasa C β pueden incluir edelfosina y fluvirusina B[2], que también son adecuados para su uso en la presente invención.

Otros inhibidores incluyen inhibidores, tales como anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos y similares. Tal como se emplea en la presente, un inhibidor de Gnaq puede ser una molécula que modula la expresión del ácido nucleico de Gnaq y/o la actividad de una proteína de Gnaq, o vías corriente abajo reguladas por Gnaq. Por ejemplo, un ejemplo no limitante de una molécula antisentido adecuada para su uso para disminuir el ARN de PKC-alfa es 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'.

Un método para seleccionar moduladores de compuestos puede emplear, por ejemplo, células de melanoma en las que Gnaq está sobreexpresado o está mutado. Estos moduladores pueden ser candidatos a moduladores de la actividad GTP-hidrolasa de Gnaq.

Otros inhibidores de Gnaq pueden identificarse ensayando la actividad Gnaq, por ejemplo, la actividad de unión a GTP o la actividad GTP-hidrolasa. Estos ensayos emplean secuencias o fragmentos de Gnaq conocidos, por ejemplo, el dominio de unión a guanina de Gnaq, o cualquiera de sus variantes. Un ejemplo de secuencia de polipéptido de Gnaq humano que podría utilizarse en estos ensayos se proporciona en SEQ ID NO:2.

Los ensayos de actividad se emplean para identificar inhibidores que pueden utilizarse como agentes terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos contra Gnaq y antagonistas de la actividad Gnaq. Los inhibidores de la actividad Gnaq se ensayan utilizando polipéptidos de Gnaq, recombinantes o naturales. La proteína puede aislarse, expresarse en una célula, expresarse en tejidos o en un animal, recombinante o natural. Por ejemplo, pueden utilizarse células transformadas. La modulación se ensaya utilizando uno de los ensayos *in vitro* o *in vivo* descritos en la presente. La actividad también puede estudiarse *in vitro* con reacciones en estado sólido o solubles, utilizando un fragmento de Gnaq que se une a otra proteína, por ejemplo, fosfolipasa C β , o GTP.

En otra realización, los niveles de expresión de ARNm y/o proteínas pueden medirse para evaluar los efectos de un compuesto de ensayo sobre los niveles de expresión de Gnaq. Una célula hospedante que expresa Gnaq se pone en contacto con un compuesto de ensayo durante un tiempo suficiente para que se produzca cualquier interacción, y después se mide el nivel de ARNm o proteínas. La cantidad de tiempo para que se produzcan dichas interacciones puede determinarse de modo empírico, tal como determinando un desarrollo en el tiempo y midiendo el nivel de expresión en función del tiempo. La cantidad de expresión puede medirse utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica que consideren adecuado.

La cantidad de expresión después se compara con la cantidad de expresión en ausencia del compuesto de ensayo. Una célula sustancialmente idéntica puede derivarse de las mismas células a partir de las cuales se preparó la célula recombinante, pero que no han sido modificadas por la introducción de ADN heterólogo. Una diferencia en la cantidad de expresión indica que el compuesto de ensayo de alguna manera ha alterado los niveles de Gnaq.

En algunos ensayos para identificar inhibidores de Gnaq, las muestras que se tratan con un inhibidor potencial se comparan con muestras control para determinar el grado de modulación. A las muestras control sin la mutación y no tratadas con los inhibidores candidatos se les asigna un valor de actividad relativa de 100. La inhibición de Gnaq se alcanza cuando el valor de actividad con relación al control es de aproximadamente 80%, opcionalmente 50%, opcionalmente 25-0%.

Los compuestos ensayados como inhibidores de Gnaq pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, por ejemplo, una macromolécula, tal como una proteína, un azúcar, un ácido nucleico o un lípido. Como alternativa, los moduladores pueden ser versiones genéticamente alteradas de Gnaq. Generalmente, los compuestos de ensayo serán moléculas químicas pequeñas y péptidos o anticuerpos.

En algunas realizaciones, los agentes tienen un peso molecular menor que 1.500 daltons, y en algunos casos menor que 1.000, 800, 600, 500, o 400 daltons. El tamaño relativamente pequeño de los agentes puede ser deseable, porque las moléculas más pequeñas tienen una mayor probabilidad de presentar propiedades fisicoquímicas compatibles con buenas propiedades farmacocinéticas, incluyendo la absorción oral, que los agentes con mayor peso molecular. Por ejemplo, Lipinski et al. han descrito a los agentes con menos probabilidad de ser buenos fármacos basándose en la permeabilidad y en la solubilidad, como sigue: tienen más de 5H-enlaces donantes (expresado como la suma de OH y NH); tienen un peso molecular mayor que 500; tiene un LogP mayor que 5 (o MLogP mayor que 4,15); y/o tienen más de 10H-enlaces aceptores (expresado como la suma de N y O). Véase, por ejemplo, Lipinski et al., *Adv. Drug Delivery Res.*, 23:3-25 (1997). Las clases de compuestos que son sustratos para transportadores biológicos son generalmente excepciones a la regla.

Casi cualquier compuesto químico puede utilizarse como modulador o ligando potencial en los ensayos de la invención. De forma más habitual, los compuestos pueden disolverse en disoluciones acuosas u orgánicas (en

especial con una base de DMSO). Los ensayos se diseñan para seleccionar grandes bancos químicos mediante etapas de ensayo automáticas, que generalmente se realizan en paralelo (por ejemplo, en formatos de microvaloración sobre placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se apreciará que existen muchos suministradores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

Ensayos de expresión

Ciertos métodos de selección implican seleccionar un compuesto que modula la expresión de Gnaq. Estos métodos en general implican realizar ensayos basados en células en los que los compuestos de ensayo se ponen en contacto con una o más células que expresan Gnaq y después se detecta una disminución en la expresión (en el transcrito o en el producto de la traducción).

La expresión puede detectarse en una serie de distintas maneras. Tal como se describe en la presente, los niveles de expresión de la proteína en una célula pueden determinarse sondando el ARNm expresado en una célula con una sonda que se hibrida de modo específico con un transcrito de Gnaq (o con un ácido nucleico complementario derivado de este). Como alternativa, la proteína puede detectarse utilizando métodos inmunológicos en los que un lisado celular se sonda con anticuerpos que se unen de modo específico con la proteína.

Otros ensayos basados en células son ensayos indicadores realizados con células que no expresan la proteína. A menudo, estos ensayos se realizan con una construcción de ácido nucleico heterólogo que incluye un promotor que está unido operablemente a un gen indicador que codifica un producto detectable.

Tratamiento del melanoma y administración de composiciones farmacéuticas y de vacuna

Los inhibidores de Gnaq pueden administrarse a un paciente para el tratamiento de un neoplasma melanocítico que tiene una mutación de secuencia en Gnaq. Tal como se describe en detalle a continuación, los inhibidores se administran de cualquier manera adecuada, opcionalmente con vehículos farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, se administran inhibidores de PKC o fosfolipasa C β . Los protocolos para la administración de inhibidores son conocidos y pueden optimizarse aún más para pacientes con melanoma basándose en principios conocidos en las técnicas farmacéuticas (Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., 1989).

Los inhibidores pueden administrarse a un paciente a dosis terapéuticamente eficaces para prevenir, tratar o controlar un neoplasma melanocítico. Los compuestos se administran a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta protectora o terapéutica eficaz en el paciente. Una respuesta terapéutica eficaz es una respuesta que al menos parcialmente detiene o frena los síntomas o las complicaciones de la enfermedad. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". La dosis será determinada por la eficacia del inhibidor de Gnaq concreto empleado y del trastorno del sujeto, así como del peso corporal o de la superficie específica del área que se va a tratar. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, la naturaleza, y el grado de cualquier efecto adverso que pueda acompañar a la administración de un compuesto concreto en un sujeto concreto.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de estos compuestos puede ser determinada mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la LD₅₀ (la dosis letal para 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los compuestos que muestran grandes índices terapéuticos. Aunque pueden emplearse compuestos que muestren efectos secundarios tóxicos, hay que tener cuidado para diseñar un sistema de transporte que dirija estos compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar los daños potenciales a las células normales y, así, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales pueden emplearse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de estos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la ED₅ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración. Para cualquier compuesto utilizado en los métodos de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática en circulación que incluye la IC₅₀ (la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas), determinada en un cultivo celular. Esta información puede utilizarse para determinar con más precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En general, el equivalente de dosis de un modulador es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico.

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención pueden formularse mediante técnicas convencionales, utilizando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Los compuestos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para la administración mediante cualquier vía adecuada, incluyendo la vía de inhalación, tópica, nasal, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal,

intravesical o intratecal) o rectal.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen agentes ligantes, por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropilmetilcelulosa; cargas, por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, o bifosfato de calcio; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, o sílice; disgregantes, por ejemplo, almidón de patata, o almidón glicolato de sodio; o agentes humectantes, por ejemplo, laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden revestirse mediante métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes, o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Estas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agentes suspensores, por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulgentes, por ejemplo, lecitina, o goma arábiga; vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados; y conservantes, por ejemplo, metil- o propil-p-hidroxibenzoatos, o ácido sórbico. Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes, agentes aromatizantes, colorantes y/o edulcorantes, según sea apropiado. Si se desea, pueden formularse de modo adecuado preparaciones para la administración oral para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos pueden administrarse de modo conveniente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo de gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador, que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, por ejemplo, lactosa o almidón.

Los compuestos pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para la inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar la forma de suspensiones, disoluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, por ejemplo, agente suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes del uso.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales, por ejemplo, supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales, por ejemplo, mantequilla de cacao u otros glicéridos.

Además, los compuestos pueden formularse como una preparación depot o de liberación lenta. Estas formulaciones de acción a largo plazo pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, de modo subcutáneo o intramuscular) o mediante una inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones, si se desea, pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, por ejemplo, un envase de blísteres. El envase o dispositivo dispensador puede venir acompañado de instrucciones para la administración.

Kits para su uso en aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico

En la presente también se describen kits para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Para aplicaciones de diagnóstico/pronóstico, estos kit pueden incluir cualquiera o todos los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, sondas de Gna, cebadores, anticuerpos o similares.

Además, los kits pueden incluir materiales instructivos que contienen directrices (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención. Aunque los materiales instructivos generalmente comprenden materiales escritos o impresos, no se limitan a estos. Cualquier medio capaz de almacenar estas instrucciones y de comunicarlas al usuario final es contemplado por esta invención. Estos medios incluyen, pero no se limitan a medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Estos medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan estos materiales instructivos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Estudio de muestras de melanoma y nevus para la presencia de una mutación de secuencia en Gnaq

Para determinar si Gnaq desempeña un papel en la neoplasia melanocítica humana, las regiones codificadoras de Gnaq se secuenciaron en un amplio espectro de tumores melanocíticos benignos y malignos. Como control también se secuenció la región codificadora de Gnaq en tejido normal circundante de biopsias seleccionadas.

Muestras biológicas

5 Se obtuvo ADN de muestras de melanoma y nevi de estudios previos (véase, Curtin, J.A., et al. (2005), N. Engl. J. Med., 353(20):2135-2147), o se obtuvo de biopsias en parafina de archivo procedentes de colecciones de San Francisco y Alemania, con la aprobación de las comisiones de evaluación institucionales de UCSF y Stanford. Todas estas muestras contenían algún tejido de lesión aislado de la dermis, puesto que las lesiones localizadas sólo en la epidermis no proporcionan ADN suficiente para el análisis.

10 *Secuenciación*

Se extrajo ADN de bloques de parafina como se ha descrito previamente. Véase, Bastian, et al. (1998), Cancer Res., 58(10): 2170-2175. La muestra de ADN se amplificó utilizando PCR, se purificó utilizando columnas de purificación de PCR y después se utilizó como molde para las reacciones de secuenciación, que se realizaron en ambas direcciones. Las muestras identificadas con mutaciones en ambas direcciones de secuenciación se replicaron al menos dos veces y se verificaron con ensayos de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Las condiciones de reacción para la secuenciación fueron de 0,25 mM de cada uno de los dNTP, 0,4x BSA (New England Biolabs), 1 U de Hotstar Taq (Qiagen), 1x tampón Hotstar Taq (Qiagen), y 0,5 uM de cada uno de los cebadores, 5'-cccacaccctattctatcattac-3' y 5'-ttttccctaagttgtaagtagtgc-3' (para el exón 5 de GNAQ). Otras secuencias de cebadores para GNAQ y GNA11 están disponibles a petición. La PCR consistió en 35 ciclos a 95 °C (30 sg), 58 °C (1 minuto), y 72 °C (1 minuto). Las reacciones de PCR se purificaron utilizando columnas y después se emplearon como moldes para las reacciones de secuenciación utilizando Big Dye (ABI), que se realizaron en ambas direcciones. Las muestras identificadas con mutaciones en ambas direcciones de la secuenciación se replicaron al menos dos veces. Las mutaciones 1-3 (tabla 2) se verificaron con un ensayo RFLP. Las mutaciones 1 y 2 crean un sitio de restricción Eco0109I, mientras que la mutación 3 (si ambos pares de bases alteradas están en el mismo alelo) produce un sitio de restricción AflIII. Por consiguiente, las muestras que muestran la mutación 3 mediante un análisis de secuenciación pueden cortarse con AflIII, demostrando que la alteración de pares de bases en tándem está dentro de un único alelo.

Ensayo sensible para detectar mutaciones de Q209 en poblaciones celulares mixtas

30 El ácido nucleico peptídico (PNA) Ac-tctctgaccttggc-CONH₂ se resuspendió en DMF al 50% y se empleó a una concentración final de 4 uM contra 2 ng de ADN molde en una reacción de 25 ul. Las condiciones de la reacción fueron dNTP 0,25 mM cada uno, 6x BSA, 2 U de Hotstar Taq, 1x tampón Hotstar Taq, y 0,5 uM de cada cebador, 5'-ttttccctaagttgtaagtagtgc-3' y 5'-atccattttctctctgacc-3'. La PCR consistió en 40 ciclos a 95 °C (1 min), 73 °C (1 min), 57 °C (45 seg), y 72 °C (1 min). Para confirmar que las muestras contenían el alelo mutante, las muestras se digirieron con AflIII y Eco0109I, que no cortan la secuencia de tipo salvaje.

35 *Resultados*

Se encontraron mutaciones de sustitución somáticas heterocigóticas de Q209 en Gnaq en 83% de los nevi azules que representan diferentes patrones de crecimiento histopatológico (tabla 1, tabla 2). La alta frecuencia de mutaciones activas constitutivas somáticas en Gnaq en los nevi azules, junto con la observación previa de que los alelos de Gnaq hipermórficos de la línea germinal conducen a una hiperpigmentación intradérmica en ratones (Van Raamsdonk et al. (2004)) sugiere que esta es la vía principal para formar este tipo de lesiones. Aunque raramente, los nevi azules puede producir un melanoma maligno, que se denomina "nevus azul maligno". Se encontró una mutación de Q209 en Gnaq en 1 de 2 muestras de "nevi azules malignos" analizadas (tabla 1, tabla 2).

45 Las biopsias de melanoma uveal mostraron mutaciones en Q209 de Gnaq en 22 de 48 muestras (46%) que tienen una mutación heterocigótica somática (no presente en el tejido normal circundante) a leucina o prolina (tabla 1, tabla 2), lo cual indica que Gnaq desempeña un papel fundamental en la formación del melanoma uveal.

Cada una de las cinco mutaciones de Gnaq detectadas en muestras de melanoma y nevi predice una sustitución no sinónima de glutamina 209 a leucina (66%), prolina (30%), arginina (2%) o tirosina (2%), tal como se muestra en la tabla 2. Cada una de estas mutaciones se confirmó utilizando un ensayo RFLP (los datos no se muestran).

Tabla 1. Frecuencia de las mutaciones de Gnaq en muestras de biopsia de melanoma y nevi.

	Diagnóstico	% de mutantes	N
Melanomas cutáneos y mucosos	Melanoma en la piel sin lesiones inducidas por exposición crónica al sol (no CSD)	0%	15
	Melanoma en la piel con lesiones inducidas por exposición crónica al sol (CSD)	4%	27
	Melanoma en la piel sin lesiones inducidas por exposición crónica al sol (no CSD)	0%	15
	Melanoma acral	0%	15
	Melanoma mucoso	0%	14
	Nevus azul maligno	50%	2
	Melanoma que surge en un nevus congénito	0%	3
	Melanoma spitzoide	0%	2
	Total		78
Nevi	Nevus azul	83%	29
	Nevus de Ota	6%	17
	Nevus congénito	0%	7
	Nevus de penetración profunda	0%	16
	Nódulo proliferativo en nevus congénito gigante	0%	7
	Nevus de Spitz	0%	8
	Total		84
Melanomas oculares	Melanoma uveal	46%	48
	Línea celular de melanoma uveal	27%	15
	Melanoma de la conjuntiva	0%	11
	Total		74
Gran total			236

Tabla 2. Tres mutaciones de Gnaq en el codón 209 en muestras de melanoma y nevi. Número de muestras con mutación.

Diagnóstico	1: CAA(Q) a CTA(L)	2: CAA(Q) a CCA(P)	3: CAA(Q) a TTA(L)	4: CAA(Q) a CGA(R)	5: CAA(Q) a TAT(Y)
Melanoma CSD	1	0	0	0	0
“Nevus azul maligno”	1	0	0	0	0
Nevus azul	17	4	4	0	0
Melanoma uveal	10	10	0	1	1
Líneas celulares de melanoma uveal	2	2	0	0	0
Total	31 (58%)	16 (30%)	4 (8%)	1 (2%)	1 (2%)

Ejemplo 2. GNAQ que tiene una mutación Q209L transforma a melanocitos

Para evaluar el efecto de GNAQ^{Q209L} sobre melanocitos humanos, se establecieron construcciones de expresión lentivíricas marcadas con epitopos para transfectar melanocitos humanos normales y genéticamente modificados, teniendo estos últimos un tiempo de vida expandido pero aún requieren factores adicionales (AMPc, TPA) para el crecimiento (melanocitos hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD}). Véase, Garraway, L.A., et al., Nature, 436(7047):117 (2005). La transfección estable de GNAQ^{Q209L} en melanocitos humanos primarios fue insuficiente para inducir un crecimiento independiente del anclaje (los datos no se muestran). En contraste, la transfección de GNAQ^{Q209L} en melanocitos hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD} produjo un crecimiento independiente del anclaje con unas eficacias comparables o ligeramente mayores que la transfección con NRAS^{Q61R} (figura 1a-b). Además, GNAQ^{Q209L} induce una morfología muy transformada en melanocitos (figura 1c).

10 *Plásmidos*

Un plásmido con la región codificadora completa de GNAQ de GNAQ^{Q209L} se obtuvo de UMR cDNA Resource Center. El homólogo de tipo salvaje se generó mediante mutagénesis dirigida específica de sitio del codón 209. Las regiones codificadoras de ambas construcciones se marcaron con epitopos con un marcador N-terminal y se clonaron en el vector de expresión lentivírico FG12. Todas las construcciones se secuenciaron para la confirmación.

15 *Cultivo celular*

Los melanocitos hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD} fueron un obsequio del Dr. David Fisher, Dana Farber Cancer Institute, y son melanocitos humanos en las vías de proteínas de p53 y p16/CDK4/retinoblastoma han sido inactivadas junto con la expresión de telomerasa (hTERT). Los melanocitos hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD} se cultivaron en medio F12 de Ham que contiene glutamina suplementado con FBS al 7%, TPA 50 ng/ml, IBMX 0,1 mM, Na₃VO₄ 10 μM, dbcAMP 1 mM. Los melanocitos normales primarios fueron un obsequio del Dr. Meenhard Herlyn, Wistar Institute, y se cultivaron en MCDB153 suplementado con FBS al 20%, FBS quelado al 2%, L-glutamina 5 μg/ml, toxina del cólera 15 μg/ml, bFGF 0,5 ng/ml, Et3 100 nM, y SCF 1,68 mM. Las líneas celulares Me1202 y 293T se cultivaron en RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10%.

Infección con lentivirus

25 Se generó un sobrenadante vírico utilizando células 293T transfectadas con 10 μg de plásmido y los plásmidos de encapsulación de lentivirus apropiados. El medio se cambió 16 hr después de la transfección, y los virus se recolectaron de 40 a 56 hr después. Se infectaron melanocitos inmortalizados y primarios humanos, y se calcularon las eficacias de infección mediante el porcentaje de células que expresan GFP.

Infección transitoria

30 Se sembraron células 293T en placas de 6 pocillos a 1 x 10⁶ células por pocillo con RPMI/FCS al 10%. Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y 2 μg de vector plasmídico pcDNATM6.2N5-DEST® Gateway (Invitrogen) solo o que contenía la región codificadora completa de GNAQ^{Q209L} o GNAQ^{WT}, respectivamente. Las células se lisaron 48 horas después de la transfección y se ensayaron para el contenido en proteínas.

35 *Ensayo de proliferación celular*

Se cuantificaron los números celulares relativos mediante el kit de ensayo de proliferación CyQUANT® Cell (Invitrogen) según el protocolo del fabricante utilizando placas de 96 pocillos. Se dejaron sin tratar 7,5 x 10³ células Me1202 o se transfectaron con ARNm no para transporte dirigido, ARNm de GNAQ, inhibidor de MEK U0126 20 μM (Promega), y se leyó la intensidad de fluorescencia después de 72 h. Las células con transfección simulada y tratamiento con DMSO se utilizaron como control.

Ejemplo 3. GNAQ^{Q209L} contribuye a la activación de la vía de MAP-quinasa en melanocitos humanos y células de melanoma uveal

Las vías de señalización corriente abajo de GNAQ incluyen la activación de miembros de la familia de la proteína quinasa C a través de la liberación de diacilglicerol (DAG) por la fosfolipasa Cβ. De manera coherente, los melanocitos transformados con GNAQ^{Q209L} crecen en agar blando en ausencia de TPA, un análogo de DAG sintético (figura 1a-b). La activación de PKC mediante la activación de GNAQ puede activar la vía de MAP-quinasa en otros tipos celulares (véase, Hubbard, K.B. y Hepler, J.R., Cell Signal, 18 (2):135 (2006); Goldsmith, Z.G. y Dhanasekaran, D.N., Oncogene, 26 (22):3122 (2007)). Los melanomas uveales muestran activación de la MAP-quinasa (véase, Zuidervaart, W. et al., Br. J. Cancer, 92 (11):2032 (2005)), pero ninguno de los melanomas uveales del estudio de los inventores muestran mutaciones en BRAF ni NRAS, lo cual es coherente con otros estudios (véase, por ejemplo, Saldanha, G. et al., Int. J. Cancer, 111 (5), 705 (2004); Cruz, F., 3^a et al., Cancer Res., 63, (18):5761 (2003)). Por tanto, los inventores ensayaron si GNAQ^{Q209L} puede contribuir a la activación de la vía de MAP-quinasa en melanocitos humanos y células de melanoma uveal. También mostrado en las figuras 2a y b, la transfección de GNAQ^{Q209L} en melanocitos hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD} produce unos mayores niveles de expresión de fosfo-ERK y ciclina D1, comparado con células control transfectadas con GNAQ de tipo salvaje (GNAQ^{WT}) o un vector vacío

(Vector). Se obtuvieron resultados similares con la transfección de GNAQ^{Q209L} en melanocitos humanos primarios y células 293T.

También se sometieron a células de melanoma uveal a un tratamiento con ARNmc que se dirige a GNAQ. Los resultados demuestran que la inactivación de GNAQ mediada por ARNmc en la línea celular de melanoma uveal Me1202, que porta la mutación GNAQ^{Q209L}, produce una disminución en los niveles de fosfo-ERK (figura 3a). Además, la inactivación de GNAQ en células Me1202 provoca una sustancial disminución en el número de células (figura 3b) y un marcado aumento en la apoptosis, comparado con células control (figura 3c). Los altos niveles de fosfo-PKC μ en células de melanoma con GNAQ mutante también se redujeron de forma drástica tras un tratamiento con dos agrupaciones diferentes de ARNmc de GNAQ, mientras que los niveles de fosfo-PKC α/β permanecen sin cambios. Por tanto, los datos implican que PKC μ desempeña un papel en el melanoma uveal. Los datos de un modelo de ratones transgénicos también implican a PKC ϵ (10).

Inmunofluorescencia

Se cultivaron melanocitos primarios humanos y hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD} sobre portaobjetos en placas de 6 pocillos y se infectaron con vectores lentivíricos que contenían GNAQ^{Q209L}, GNAQ^{WT}, o un vector vacío como control. Cinco días después de la infección, las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Triton X100 al 0,2% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente y se incubaron con albúmina de suero bovino al 3% durante 10 min a temperatura ambiente como etapa de bloqueo. Se detectaron los anticuerpos contra pERK (E-4, Santa Cruz Biotechnology), ciclina D1 (M-20, Santa Cruz Biotechnology) y GNAQ (C-19, Santa Cruz Biotechnology) utilizando anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor 594 y 532 (Molecular Probes). Se tomaron imágenes a exposiciones fijadas con un microscopio Axio Image M1 (Zeiss, Alemania) equipado con una cámara de escala de grises M4⁺CL y el programa informático Isis (Metasystems, Alemania). Se cuantificaron las intensidades de fluorescencia de las células individuales utilizando el programa informático ImageJ y se emplearon las intensidades de píxel medias para el análisis estadístico utilizando Microsoft Excel y Data Desk.

Ensayo en agar blando

Se suspendieron melanocitos primarios humanos (10 x 10⁴) y melanocitos hTERT/CDK4^{R24C}/p53^{DD} que expresan de forma estable GNAQ^{Q209L}, GNAQ^{WT}, NRAS^{Q61R}, o un vector control en medio completo que contenía agar al 0,35% y se cultivaron sobre una capa inferior de agar al 0,5% en placas de 6 pocillos. Después de 28 días, las células se tiñeron con violeta cristal al 0,005%. Las imágenes de las colonias se capturaron utilizando un escáner plano a 600 dpi. El número y el tamaño de las colonias se cuantificó utilizando el programa informático ImageJ.

Análisis del ciclo celular

Células Me1202 transfectadas con ARNmc se tripsinizaron, se lavaron con PBS frío y se fijaron con etanol al 70%. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio en tampón de tinción de ARNasa (BD Pharmingen). Las mediciones del ciclo celular se realizaron en un FACSCalibur (BD Pharmingen), con un mínimo de 20.000 acontecimientos, y los perfiles se analizaron utilizando FlowJo y ModFit.

Transfección de ARNmc

Células Me1202 se cultivaron en RPMI/FCS al 10% en placas de 6 pocillos o de 96 pocillos a 1,5 x 10⁵ o 5 x 10³ células por pocillo, respectivamente. Se emplearon dos agrupaciones diferentes, cada una formada por cuatro dúplex de ARNmc (Dharmacon) (agrupación 1: 5'-CAAUAAGGCUCAUGCACAAUU-3', 5'-CGACGAGAAUAUCAUUUAUUU-3', 5'-GCAAGAGUACGUUUUAUCAUUU-3', 5'-UAGUAGCGCUUAGUGAAUAUU-3'; agrupación 2: 5'-AUGCACAAUAGUUCGAGAUU-3', 5'-UAUGAUAGACGACGAGAAUUU-3', 5'-CAGACAAUGAGAACCGAAUUU-3', 5'-CGCCACAGACACCGAGAAUUU-3'). Los ARNmc control incluyen anticiclofilina B, y ARNmc no para transporte dirigido (ambos de Dharmacon). Todas las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamine RNAiMax (1 μ l/pmól de ARNmc) a una concentración final de 100 nM. Los complejos de ARNmc se formaron en Optimem. Las células se lisaron para el análisis 72-96 horas después de la transfección.

Análisis de la transferencia Western

Las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo y se lisaron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, NP-40 al 1%, glicerol al 10%, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio al 1%, dodecilsulfato de sodio al 1%) suplementado con inhibidor de proteasa, cóctel de inhibidores de fosfatasa, y EDTA (Pierce Biotechnologies). Se determinó el contenido en proteínas del lisado mediante el reactivo de ensayo de proteínas BCD (Pierce Biotechnologies). Se separaron 5-20 μ g de proteína mediante SDS-PAGE, se trasladaron a una membrana Immobilon-P (Millipore) para la inmunodetección. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: pERK (E-4, Santa Cruz Biotechnology), ciclina D1 (M-20, Santa Cruz Biotechnology) y GNAQ (C-19, Santa Cruz Biotechnology), fosfo-Akt (736E11, Cell Signaling), ciclofilina B (Abeam), anti-FLAG M2 (Sigma), anti-ERK 1/2 pAb (Promega), y β -actina (Sigma). Se emplearon anti-conejo o anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano (Upstate) como anticuerpos secundarios.

Análisis estadístico

Los datos de inmunofluorescencia y las mediciones de CyQUANT se analizaron utilizando el ensayo de la t de Student. Se empleó el ensayo exacto de Fisher para comparar la proporción de células atípicas.

Ejemplos de secuencias de GNAQ:

5 SEQ ID NO:1, nº de registro NM_002072, proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G) q (GNAQ), ARNm

```

1 agggggtgcc ggcggggtg cagcggaggc actttggaag aatgactctg gagtccatca
61 tggcgtgctg cctgagcgag gaggccaagg aagcccggcg gatcaacgac gagatcgagc
121 ggcagctccg cagggacaag cgggacgccc gccgggagct caagctgctg ctgctcggga
181 caggagagag tggcaagagt acgtttatca agcagatgag aatcatccat gggtcaggat
241 actctgatga agataaaaagg ggcttcacca agctggtgta tcagaacatc ttcacggcca
301 tgcaggccat gatcagagcc atggacacac tcaagatccc atacaagtat gagcacaata
361 aggctcatgc acaattagtt cgagaagttg atgtggagaa ggtgtctgct tttgagaatc
421 catatgtaga tgcaataaag agtttatgga atgatcctgg aatccaggaa tgctatgata
481 gacgacgaga atatcaatta tctgactcta ccaaatacta tcttaatgac ttggaccgcg
541 tagctgacc tgcctacctg cctacgcaac aagatgtgct tagagtctga gtcccacca
601 cagggatcat cgaatacccc tttgacttac aaagtgtcat tttcagaatg gtcgatgtag
661 ggggccaaaag gtcagagaga agaaaatgga tacactgctt tgaaaatgtc acctctatca
721 tgtttctagt agcgcttagt gaatatgatc aagtctctgt ggagtcagac aatgagaacc
781 gaatggagga aagcaaggct ctctttagaa caattatcac ataccctgg ttcagaact
841 cctcggttat tctgttctta aacaagaaag atcttctaga ggagaaaatc atgtattccc
901 atctagtcca ctacttcca gaatatgatg gaccccagag agatgccag gcagcccag
961 aattcattct gaagatgttc gtggacctga acccagacag tgacaaaatt atctactccc
1021 acttcacgtg cgccacagac accgagaata tccgctttgt ctttgctgcc gtcaaggaca
1081 ccatcctcca gttgaacctg aaggagtaca atctggtcta attgtgcctc ctagacacc
1141 gccctgccct tccctggtgg gctattgaag atacacaaga gggactgtat ttctgtgaa
1201 aacaatttgc ataatactaa tttattgccg tcctggactc tgtgtgagcg tgtccacaga
1261 gttttagta aatattatga ttttatttaa actattcaga ggaaaaacag aggatgctga
1321 agtacagtcc cagcacattt cctctctatc ttttttttag gcaaacctt gtgactcagt
1381 gtattttaa ttctcagtca tgcactcaca aagataagac ttgtttcttt ctgtctctct
1441 ctcttttct tttctatgga gcaaaaacaaa gctgatttcc ctttttctt cccccgctaa
1501 ttcatacctc cctcctgatg tttttcccag gttacaatgg cttttatcct agttccattc
1561 ttggtcaagt ttttctctca aatgatacag tcaggacaca tcgttcgatt taagccatca
1621 tcagcttaat ttaagtttgt agtttttgt gaaggattat atgtattaat acttacggtt
1681 ttaaagtgtg tgctttggat acacacatag tttctttttt aatagaatat actgtcttgt
1741 ctcactttgg actgggacag tggatgccca tctaaaagtt aagtgtcatt tcttttagat
1801 gtttaccttc agccatagct tgattgctca gagaaatatg cagaaggcag gatcaaagac
1861 acacaggagt cttttctttt gaaatgccac gtgccattgt ctttctccc ttctttgctt
1921 cttttcttta ccctctcttt caattgcaga tgccaaaaaa gatgccaaaca gacactacat
1981 taccctaagt gctgctacct agaacctttt tataggttgt tcttaatttt tttgttgtt
2041 ttgttcaagc ttttctttc tttttttct tagtgtttgg gccacgattt taaaatgact
2101 tttattatgg gtatgtgttg ccaagctgg ctttttgtca aataaaatga atacgaactt
2161 aaaaaataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa

```

ES 2 392 637 T3

SEQ ID NO:2, nº de registro NM_002063.2, proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), polipéptido q
[*Homo sapiens*]

```
1 mtlesimacc lseeakearr indeierqlr rdkrdarrel kl111gtges gkstfikqmr
61 iihgsgysde dkrqftklvy qniftamqam iramdtlkip ykyehnkaha qlvrevdvek
121 vsafenpyvd aikslwndpg iqecydrre yqlsdstky lndldrpadp aylptqqdvl
181 rvrvpttgii eypfdlqsvi frmvdvqqqr serrkwihcf envtsimflv alseydqvlv
241 esdnenrmee skalfrtiit ypwfqnssvi lflnkkdle ekimyshlvd yfpeydgpqr
301 daqaarefil kmfvdlnpds dkiiyshftc atdtenirfv faavkdt1lq ln1keynlv
```

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para detectar una célula de neoplasma melanocítico en una muestra biológica procedente de un paciente, comprendiendo dicho método:
- 5 detectar la presencia o la ausencia de una mutación activadora en un gen Gnaq en la muestra biológica,
- en el que la presencia de la mutación es indicativa de la presencia de células de neoplasma melanocítico en la muestra biológica.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que la mutación es una mutación de secuencia en el codón que codifica Gln 209 de Gnaq, opcionalmente en el que la mutación es una sustitución Q209L o Q209P.
- 3.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de detección comprende detectar la presencia o la ausencia de la mutación en una muestra de ácido nucleico procedente de la muestra biológica.
- 10 4.- El método de la reivindicación 3, en el que:
- (a) la etapa de detección comprende poner en contacto la muestra de ácido nucleico con una sonda que se hibrida de modo selectivo con el gen Gnaq, y detectar la presencia de la sonda hibridada, detectando con ello la mutación de secuencia, y opcionalmente en el que la etapa de contacto se realiza en una hibridación *in situ*; o
- 15 (b) la etapa de detección comprende una reacción de amplificación, que opcionalmente comprende determinar la secuencia de la región mutada del gen Gnaq.
- 5.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de detección comprende detectar la mutación en una proteína codificada por el gen.
- 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es:
- 20 (a) una muestra de ojo, o una muestra de piel; o
- (b) procede de nódulo linfático, pulmón, hígado, glándula adrenal, tejido blando, o hueso.
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica procede de un paciente que tiene melanoma, opcionalmente en el que el melanoma ha surgido de la úvea, un nevus azul, o piel con daños por exposición crónica al sol.
- 25 8.- Un método para controlar el avance de un melanoma en un paciente sometido a una terapia, comprendiendo dicho método detectar un cambio en el número de células que tienen una mutación activadora en un gen Gnaq en una muestra biológica procedente del paciente, en el que un cambio en el número de células que tienen la mutación Gnaq es indicativo de la respuesta del paciente a la terapia.
- 9.- El método de la reivindicación 8, en el que la muestra biológica procede de:
- 30 (a) ojo, o piel; o
- (b) sangre, nódulo linfático, hígado, glándula adrenal, o hueso.
- 10.- Un antagonista de Gnaq para su uso en un método para inhibir la proliferación de células de melanoma que tienen una mutación activadora en GNAQ en un paciente que tiene melanoma, en el que el antagonista de Gnaq es un inhibidor de proteína quinasa C, un inhibidor de fosfolipasa C β , un anticuerpo contra Gnaq, o un inhibidor de ácido nucleico de Gnaq que es un ARNmc o un ARN antisentido.
- 35 11.- El antagonista de Gnaq para el uso de la reivindicación 10, en el que las células de melanoma son de un melanoma uveal, surgen de un nevus azul, o son de piel con daños por exposición crónica al sol.
- 12.- El antagonista de Gnaq para el uso de la reivindicación 10 u 11, en el que la mutación está en un codón que codifica Gln 209 de Gnaq.
- 40 13.- El antagonista de Gnaq para el uso de la reivindicación 10, 11 o 12, en el que el antagonista de Gnaq es un inhibidor de ácido nucleico de Gnaq, y es un ARNmc o un ARN antisentido.
- 14.- El antagonista de Gnaq para el uso de la reivindicación 10, 11 o 12, en el que el antagonista de Gnaq es un anticuerpo contra Gnaq.
- 45 15.- El antagonista de Gnaq para el uso de la reivindicación 10, 11 o 12, en el que el antagonista de Gnaq es un inhibidor de proteína quinasa C.
- 16.- Un método para identificar un paciente con melanoma que es un candidato para un tratamiento con un inhibidor

de Gnaq, comprendiendo dicho método detectar la presencia o la ausencia de una mutación activadora en un gen Gnaq en una muestra biológica procedente de un melanoma presente en el paciente, en el que la presencia de la mutación es indicativa de un paciente con melanoma que es un candidato para un tratamiento con un inhibidor de Gnaq.

5 17.- El método de la reivindicación 16, en el que:

(a) la mutación está en un codón que codifica Gln 209 de Gnaq;

(b) el melanoma es un melanoma uveal, un nevus azul maligno, o un melanoma sobre piel con daños por exposición crónica al sol; o

(c) la etapa de detección comprende detectar la mutación en una proteína codificada por el gen.

10 18.- Un método para determinar el riesgo de avance de un nevus hacia un melanoma, comprendiendo dicho método detectar la presencia o la ausencia de una mutación activadora en un gen Gnaq en una muestra biológica procedente del nevus, en el que la presencia de la mutación es indicativa de un mayor riesgo de avance del nevus hacia un melanoma.

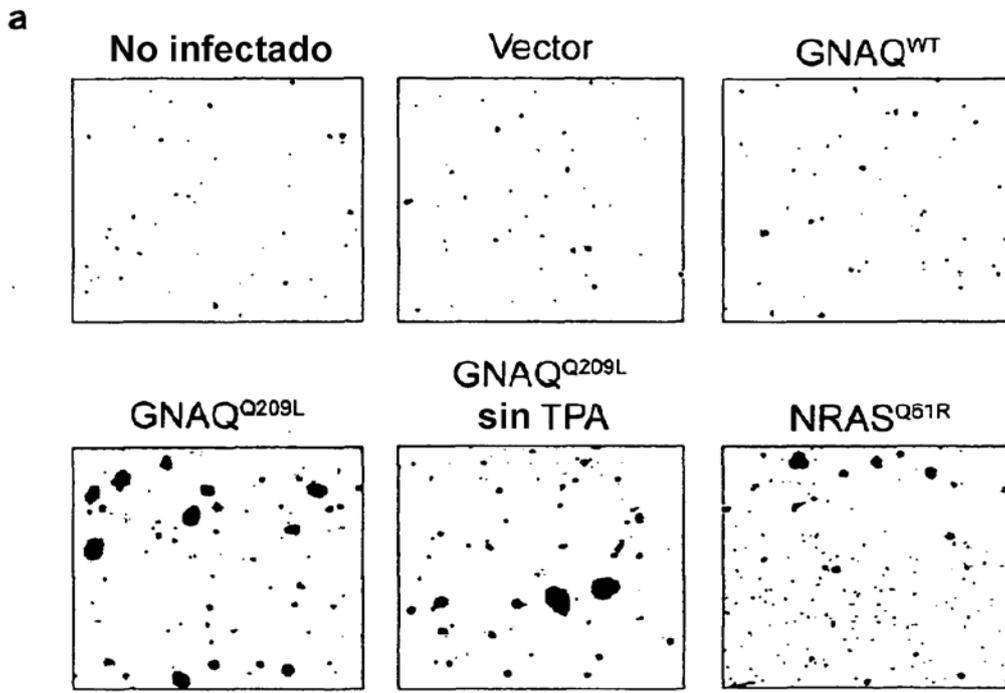
19.- El método de la reivindicación 18, en el que:

15 (a) la mutación de secuencia es en un codón que codifica Gln 209 de Gnaq;

(b) el nevus es un nevus azul, opcionalmente en el que el nevus es un nevus de Ota; o

(c) la etapa de detección comprende detectar la mutación en una proteína codificada por el gen.

Figura 1a-1c



b

	Tamaño			Valor de p
	nº de colonias	medio de las colon.	Desv. estand.	
No infectado	334	0,17	0,25	
Vector	257	0,12	0,10	0,5899
GNAQ ^{WT}	377	0,16	0,23	0,5134
GNAQ ^{Q209L}	692	0,38	0,62	<0,0001
GNAQ ^{Q209L} sin TPA	593	0,99	1,35	<0,0001
NRAS ^{Q61R}	628	0,30	0,35	<0,0001

c

	n	% de células anómalas	Valor de p
Vector	154	7,8	
GNAQ ^{WT}	172	5,8	0,5140
GNAQ ^{Q209L}	198	48,9	<0,0001

Figura 2a-2b

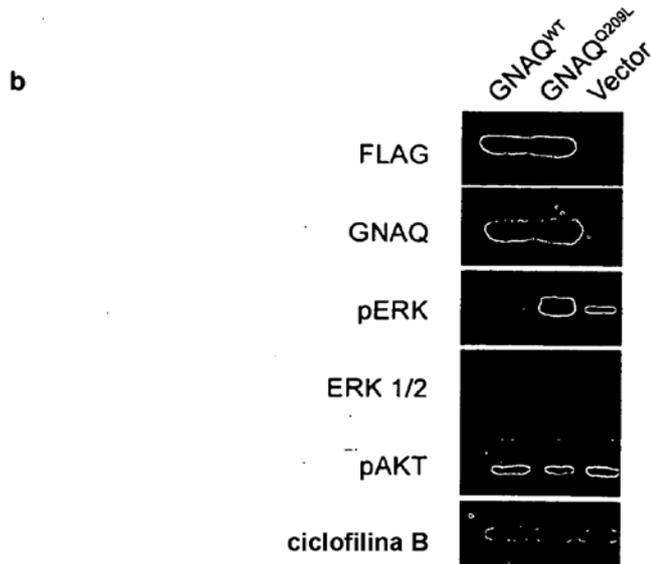
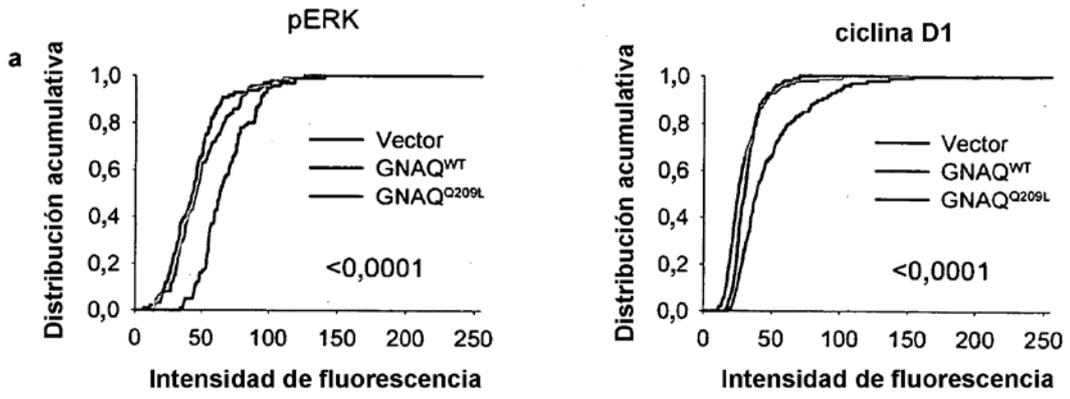


Figura 3a-3c

