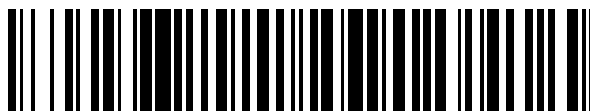


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 131**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2007** **E 10168717 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2229946**

54 Título: **Uso de la proteína estimulante del crecimiento KIAA1524**

30 Prioridad:

**16.03.2006 FI 20060246**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.11.2013**

73 Titular/es:

**TURUN YLIOPISTO (100.0%)**  
**Yliopistonmäki**  
**20014 Turun Yliopisto, FI**

72 Inventor/es:

**WESTERMARCK, JUKKA;**  
**PUUSTINEN, PIETRI y**  
**JUNTILA, MELISSA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 429 131 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de la proteína estimulante del crecimiento KIAA1524

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de un agente que inhibe una proteína estimulante del crecimiento recién descubierta para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar un cáncer, o prevenir o tratar crecimiento canceroso, invasión o metástasis, o prevenir o tratar otras enfermedades hiperproliferativas en un individuo, regulando negativamente la expresión de dicha proteína estimulante del crecimiento o inactivando dicha proteína.

**Antecedentes de la invención**

El cáncer es una enfermedad devastadora que afecta a todas las comunidades en todo el mundo. Se ha estimado que 1 de cada 2 hombres y 1 de cada 3 mujeres desarrollarán alguna forma de cáncer durante su vida. También se ha estimado que más de 550.000 personas morirán debido al cáncer en los Estados Unidos solamente durante 2005. El cáncer es un término generalizado para un conjunto complejo y ampliamente diferente de enfermedades relacionadas con el crecimiento incontrolado, supervivencia e invasión de células. Aunque hay más de 100 tipos diferentes de cáncer, así como subtipos de cada uno, estudios recientes han revelado un número limitado de elementos genéticos que se requieren para la transformación de células benignas en células cancerosas (Zhao *et al.*, 2004). En general, se ha concluido que la transformación de células humanas requiere la activación de GTPasa Ras, sobreexpresión de telomerasa, inactivación de proteínas supresoras de tumores p53 y proteína retinoblastoma (Rb) e inhibición de proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Zhao *et al.*, 2004). Es obvio que el entendimiento de la función de estos elementos genéticos podría conducir al desarrollo de terapias de cáncer que se podrían aplicar ampliamente a diferentes tipos de cáncer.

Se conocen en la técnica muchas proteínas asociadas con cáncer. Por ejemplo, la expresión potenciada del autoantígeno p90, también conocido como KIAA1524, se ha detectado en cáncer de próstata humana (Fu-Dong Shi, Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cáncer Res., 2003, 44: 360-361; Fu-Dong Shi *et al.*, Prostate, 2005, 63: 252-258) así como en cánceres gástricos y de hígado humanos (Linda Soo Hoo *et al.* Mol. Bio. Cell, 2000, Supl., 11: 357a; Linda Soo Hoo *et al.*, Oncogene, 2002, 21: 5006-5015). Sin embargo, el papel de KIAA1524 en la patogénesis del cáncer no se conoce.

Como se ha descrito anteriormente, la inhibición de la actividad de PP2A se ha identificado como uno de los prerrequisitos para la transformación de células humanas primarias (Zhao *et al.*, 2004). PP2A es un complejo proteico trimérico que consiste en una subunidad catalítica (PP2Ac o C), una subunidad de armazón (PR65 o A) y una de las subunidades B reguladoras alternativas (Figura 1A) (Janssens y Goris, 2001). PP2A regula el comportamiento celular desfosforilando restos ser/thr reguladores de las proteína quinasas y otras proteínas de señalización. El factor de transcripción oncogénico c-Myc es uno de los muchos sustratos para PP2A. Se ha mostrado recientemente que la desfosforilación mediada por PP2A de serina 62 en c-Myc da como resultado la degradación proteosómica de la proteína (Yeh *et al.*, 2004). Resulta importante que el antígeno t pequeño viral, que inactiva PP2A, ejerce su potencial oncogénico mediante estabilización de c-Myc (Yeh *et al.*, 2004).

Incluso aunque la importancia de la inhibición de PP2A para la transformación de células humanas se ha establecido firmemente usando antígenos virales como herramientas de investigación, en la actualidad no se entienden los mecanismos moleculares por los que se produce inhibición de PP2A en células cancerosas humanas transformadas de forma espontánea. Hay por lo tanto una necesidad identificada para dilucidar el mecanismo por el que PP2A inhibe la transformación.

**Breve descripción de la invención**

La invención se basa en el descubrimiento de una proteína estimulante del crecimiento. Los inventores de la presente invención han descubierto que la proteína KIAA1524 (número de referencia de GenBank AAI30565; SEC ID N°: 1) es un inhibidor endógeno de proteína fosfatasa 2A (PP2A) y que la proteína KIAA1524 se requiere para crecimiento tumoral y proliferación de células cancerosas y que la proteína KIAA1524 está regulada positivamente en tejido canceroso.

La invención se refiere al uso de un oligonucleótido antisentido, un ARN de interferencia pequeño (ARNip), o una ribozima, que inhibe KIAA1524 para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar, prevenir y/o aliviar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas.

De acuerdo con una realización específica, el agente previene o inhibe la proliferación y el crecimiento celular inhibiendo que dicha proteína KIAA1524 interaccione con el complejo de PP2A o con el factor de transcripción c-Myc, o en el que dicho agente inhibe los efectos proliferativos y de crecimiento de KIAA1524 que no dependen de la interacción de KIAA1524 con PP2A o c-Myc.

De acuerdo con otra realización específica, dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de células escamosas de la región de cabeza y cuello, cáncer de mama y cáncer de colon.

De acuerdo con otra realización más, dicha enfermedad hiperproliferativa se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, hipertrofia miocárdica y tumor benigno.

- 5 De acuerdo con una realización adicional, dicho ARNip se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 2 a 6.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. KIAA1524 es un inhibidor endógeno de PP2A. La Figura 1A) muestra una imagen esquemática del complejo de PP2A que contiene armazón PR65, subunidad catalítica PP2Ac y una subunidad B reguladora. Se muestra la fusión de TAP de la proteína PR65 usada en la purificación de TAP. Figura 1B) purificación de TAP del complejo proteico de PR65 de las células de fibrosarcoma HT-1080. Se identificaron proteínas en los eluatos de PR65TAP mediante secuenciación peptídica por espectrometría de masas. Figura 1C) El análisis por coimmunoprecipitación de extractos citoplasmáticos de células HeLa con anticuerpo PR65 revela la interacción entre las proteínas endógenas KIAA1524, PR65 y PP2Ac. PI, suero preinmune; entrada, material de entrada. Figura 1D) Identificación de un mutante de proteína KIAA1524 deficiente en unión de PR65 mediante análisis de coimmunoprecipitación. Figura 1E) Se analizaron células HeLa transfectadas con construcciones de expresión indicadas mediante microscopia confocal para colocalización de KIA1524-PP2Ac. Figura 1F) El agotamiento mediado por ARNip de la expresión de proteína KIAA1524 en células HeLa potencia la actividad serina/treonina fosfatasa de PP2Ac inmunoprecipitado.

Figura 2. Proteína KIAA1524. Figura 2A) La estructura predicha de proteína KIAA1524 revela varios dominios de interacción proteína-proteína potenciales. La proteína KIAA1524mut analizada en las figuras 1D y 1E. Figura 2B) secuencia de aminoácidos de la proteína KIAA1524 (SEC ID N° 1).

Figura 3. Identificación del dominio de interacción de PP2A en KIAA1524. Figura 3A) Coimmunoprecipitación de las construcciones de supresión de KIAA1524 con PR65 engódeno de lisados celulares de HeLa. Se analizó la coimmunoprecipitación de proteínas Flag-KIAA1524 indicadas y el complejo de PP2A mediante transferencia de wester de los inmunoprecipitados anti-Flag con el anticuerpo PR65. La eficacia de inmunoprecipitación de las delecciones de KIAA1524 se confirmó mediante inmunotransferencia de KIAA1524. Figura 3B) Identificación de dominio que interacciona con PP2A potencial en KIAA1524. Los resultados en la Figura 3A muestran que KIAA1524 natural interacciona con PP2A (PR65), mientras que KIAA1524 en la que el dominio 461-533 está suprimido presenta interacción alterada con PP2A. Por lo tanto, se espera que el dominio de KIAA1524 461-533 medie en la interacción entre KIAA1524 y PP2A.

Figura 4. KIAA1524 inhibe la actividad de PP2A asociada con c-Myc y degradación de c-Myc. Figura 4A) el agotamiento inducido por ARNip de proteína KIAA1524 da como resultado regulación negativa de la expresión proteica de c-Myc en células HeLa. Figura 4B) el agotamiento inducido por ARNip de proteína KIAA1524 no inhibe la expresión de ARNm de c-Myc. Figura 4C) el agotamiento inducido por ARNip de proteína KIAA1524 potencia la actividad de PP2A en inmunoprecipitados de c-Myc. Figura 4D) la proteína KIAA1524 no regula la interacción entre las proteínas PP2Ac y c-Myc. Las células HeLa transfectadas con ARNip mezclado o KIAA1524 se sometieron a análisis por coimmunoprecipitación con anticuerpo específico de c-Myc. Las proteínas en los inmunoprecipitados se estudiaron posteriormente mediante los anticuerpos indicados.

Figura 5. Identificación del dominio de interacción de KIAA1524 en c-Myc. Figura 5A) Ensayo de unión *in vitro* con proteína Flag-KIAA1524 recombinante y movilizada y proteína GST recombinante o con proteína GST-c-Myc 1-262. Inmunotransferencias de eluatos con GST (parte superior) o KIAA1524 (parte inferior). Entrada: Proteínas GST usadas para ensayo de interacción. Se muestra una mancha de transferencia representativa de tres experimentos independientes con resultados similares. Figura 5B) Presentación esquemática de la identificación de c-Myc 105-262 como el dominio de unión de KIAA1524 en c-Myc. KIAA1524.

Figura 6. Se requiere KIAA1524 para el crecimiento de células cancerosas. Figura 6(A) Incorporación de timidina de células HeLa transfectadas durante 72 horas con ARNip mezclado o KIAA1524 para proliferación celular. Se muestra la media + D.T. de cuatro experimentos. \*  $p < 0,05$ , ensayo de t de Student. Figura 6B) Análisis de citometría de flujo del contenido de ADN con respecto a la progresión del ciclo celular de células HeLa transfectadas con ARNip mezclado o KIAA1524 durante 72 horas. Los resultados son de un experimento representativo de cuatro repeticiones con resultados similares. Figura 6C) El agotamiento de KIAA1524 no induce escisión de Poli (ADP-ribosa) Polimerasa (PARP) en células HeLa como se detecta por inmunotransferencia 72 horas después de la transfección de ARNip KIAA1524. Los pesos moleculares esperados de las formas de longitud completa (110 kD) y escindidas por caspasa de proteínas PARP se muestran a la derecha. Figura 6D) Formación de focos densos en una monocapa de células HeLa transfectadas con ARNip mezclado o KIAA1524. Parte de arriba, imágenes de microscopia óptica representativas. Parte de abajo, cuantificación de número de focos 10 días después de volver a sembrar en placas mediante software Image J. Se muestra la media + D.T. de cuatro experimentos. \*  $p = 0,002$ , ensayo de t de Student. Figura 6E) El agotamiento inducido por ARNip de proteína KIAA1524 inhibe el crecimiento independiente de anclaje de células HeLa en agar. Figura 6F) Se analizaron células HeLa transfectadas con ARNip

mezclado (Ser) o KIAA1524 con respecto a crecimiento tumoral en ratones inmunocomprometidos. Se muestra la media + DT de volúmenes tumorales de seis ratones en cada grupo. Figura 6G) Pesos (mg) de tumores de un experimento independiente realizado de forma similar al experimento mostrado en la Figura 6F) el día 27. \*  $p=0,034$ , ensayo de U Mann-Whitney.

- 5 Figura 7. Se sobreexpresa KIAA1524 en carcinomas de células escamosas humanas de cabeza y cuello (HNSCC). Figura 7A) La expresión de ARNm de KIAA1524 se cuantificó por análisis de RT-PCR cuantitativa a partir de muestras tisulares normales. La expresión de KIAA1524 se presenta en relación con  $\beta$  actina. Figura 7B) Se estudió la expresión de ARNm de KIAA1524 a partir de líneas celulares de HNSCC y de queratinocitos epidérmicos humanos (HEK) mediante análisis por PCR en tiempo real Taqman. Figura 7C) Se estudió la expresión de ARNm de KIAA1524 a partir de muestras tumorales de HNSCC y de muestras de control tisulares normales mediante análisis por PCR en tiempo real Taqman. Figura 7D) El análisis de inmunotinción de tejido HNSCC con anticuerpo de KIAA1524 muestra tinción de KIAA1524 citoplásmica intensa en células tumorales (nódulos de células tumorales indicados por flechas). Figura 7E) el agotamiento inducido por ARNip de proteína KIAA1524 da como resultado la regulación negativa de la expresión proteica de c-Myc en líneas celulares de HNSCC.
- 10
- 15 Figura 8. KIAA1524 se sobreexpresa en cánceres de colon humanos. Figura 8A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión de ARNm de KIAA1524 en tejidos cancerosos de colon y en tejidos de colon no malignos (control). Se muestra la expresión media de muestras + D.T. \*  $p<0,05$ , ensayo de U de Mann-Whitney. Figura 8B) Asociación entre el nivel de expresión de KIAA1524 y el grado tumoral en cánceres de colon humanos. Se observaron diferencias estadísticas en la expresión de KIAA1524 entre los grados III-IV y el grado II (\*  $p<0,0001$ , ensayo de U de Mann-Whitney) y entre los grados III-IV y muestras normales (\*  $p=0,0019$ , ensayo de U de Mann-Whitney).
- 20

Figura 9. KIAA1524 se sobreexpresa en cánceres de mama humanos. Figura 9A) expresión de KIAA1524 en tejido mamario normal o tumoral. Figura 9B) La expresión de KIAA1524 depende del tipo de tumor mamario humano. Se usó el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon de dos muestras (Mann-Whitney) para análisis estadístico. \*  $p < 0,05$  en comparación con mama normal; \*\*  $p < 0,005$  en comparación con tumores mucinosos. Se usó el gen constitutivo de  $\beta$  actina para normalización.

25

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la identificación de KIAA1524 como una proteína estimulante del crecimiento, que interacciona con PP2A e inhibe la actividad supresora de tumores de la misma. Por lo tanto, se sugiere KIAA1524 como una diana para nuevos agentes antineoplásicos o antiproliferativos.

- 30 Se identificó KIAA1524 como una proteína que interacciona con PP2A basándose en la coimmunoprecipitación con proteína PR65, una subunidad de armazón de complejo de proteína PP2A y posterior secuenciación peptídica por espectrometría de masas. La capacidad de KIAA1524 para interaccionar con el complejo de PP2A se demostró mediante análisis de coimmunoprecipitación de proteínas PR65 endógenas y usando mutantes de delección de KIAA1524. Además el papel funcional de KIAA1524 como inhibidor de PP2A se demostró agotando KIAA1524 mediante oligos de ARN de interferencia cortos (ARNip) dirigidos a KIA1524, lo que dio como resultado la estimulación de la actividad fosfatasa de PP2A.
- 35

Además, basándose en experimentos de coimmunoprecipitación, KIAA1524 se identificó como una proteína que interacciona directamente con el factor de transcripción c-Myc. Se mostró que dicha interacción estabilizaba la proteína c-Myc promoviendo de este modo su potencial oncogénico.

- 40 El papel de KIAA1524 en la regulación del comportamiento de las células cancerosas se estudió por ejemplo transfectando células con ARNip de KIAA1524 y determinando posteriormente la proliferación celular tanto en un cultivo celular como en un modelo de ratón *in vivo*. El agotamiento de KIAA1524 dio como resultado la inhibición de la proliferación celular e inhibición del crecimiento independiente de anclaje de las células, así como la formación de tumores comprometida en ratones. Además, se descubrió que KIAA1524 se sobreexpresaba en tumores malignos humanos tales como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de colon y cáncer de mama. Especialmente se descubrió sobreexpresión de KIAA1524 en tumores invasivos de cáncer de colon y cáncer de mama en comparación con tumores no invasivos del mismo origen. Estos y otros resultados desvelados posteriormente indican que KIAA1524 promueve el crecimiento de células cancerosas y por lo tanto KIAA1524 actúa como una diana para compuestos terapéuticos de cáncer.
- 45
- 50 Como se ha usado a lo largo de la presente memoria descriptiva, la expresión "inhibir KIAA1524" incluye regular negativamente la expresión de KIAA1524, inhibir la actividad de KIAA1524, inactivar KIAA1524, así como inhibir la interacción de KIAA1524 con el complejo de PP2A o c-Myc. Las palabras inhibir y bloquear se usan de forma intercambiable.

La presente invención se dirige al uso de un agente, que es un oligonucleótido antisentido, un ARN de interferencia pequeño (ARNip), o una ribozima, e inhibe KIAA1524 en un paciente humano o animal, para la fabricación de una composición farmacéutica. Se cree que esta composición farmacéutica puede ser útil para tratar cualquier cáncer. Sin embargo, dicha composición farmacéutica es especialmente adecuada para tratar o prevenir cánceres localizados en ciertos tejidos y cánceres que sería difícil o imposible tratar mediante cirugía o radiación. Como

55

ejemplo de dichos cánceres, pueden mencionarse carcinomas de células escamosas de la cabeza y cuello, cáncer de colon y cáncer de mama.

Se cree que esta composición farmacéutica también puede ser útil para tratar una enfermedad hiperproliferativa en la que se exprese KIAA1524. Un ejemplo de dichas enfermedades es psoriasis, hipertrofia miocárdica y tumor benigno, tal como adenoma, hamartoma y condroma.

La composición farmacéutica puede usarse como el único régimen de tratamiento o prevención, o como una terapia adyuvante, combinada con otros regímenes tales como administración de agentes citotóxicos, cirugía, radioterapia, inmunoterapia, etc.

Dicho agente, que inhibe KIAA1524, es un agente que regula negativamente la expresión de KIAA1524.

La regulación negativa de la KIAA1524 es posible, por ejemplo, mediante el uso de un oligonucleótido antisentido, nucleótido modificado, secuencia de combinación de diferentes tipos de nucleótidos para evitar o modificar la síntesis de KIAA1524. El oligonucleótido antisentido puede ser una molécula de ADN o una molécula de ARN.

También se incluyen ribozimas que escinden el ARNm de KIAA1524. La tecnología de ribozimas se describe por ejemplo en la siguiente publicación: Ribozyme technology for cancer gene target identification and validation. Li *et al.*, Adv. Cáncer Res. 2007; 96:103-43. También serían útiles moléculas de ARN para interferencia pequeñas (ARNip). La aplicación de ARNip se ha vuelto importante en el desarrollo de nuevas terapias en los últimos años. O Heidenreich presenta una visión de conjunto de aplicaciones farmacéuticas en el artículo "Forging therapeutics from small interfering RNAs" en European Pharmaceutical Review Issue 1, 2005. El principio se ha sugerido particularmente para el tratamiento de tumores y carcinomas, sarcomas, hipercolesterolemia, neuroblastoma y queratitis del estroma herpético.

El principio de ARNip se presenta exhaustivamente en la bibliografía. Como ejemplos pueden mencionarse las publicaciones de patente de Estados Unidos 2003/0143732, 2003/0148507, 2003/0175950, 2003/0190635, 2004/0019001, 2005/0008617 y 2005/0043266. Una molécula bicatenaria de ARNip comprende una región antisentido y una hebra con sentido en la que dicha hebra antisentido comprende secuencia complementaria a una región diana en una secuencia de ARNm que codifica cierta proteína, y la hebra con sentido comprende secuencia complementaria a dicha hebra antisentido. Por lo tanto, la molécula bicatenaria de ARNip se ensambla a partir de dos fragmentos de ácido nucleico en los que un fragmento comprende la hebra antisentido y el segundo fragmento comprende la hebra con sentido de dicha molécula de ARNip. La hebra con sentido y la hebra antisentido pueden conectarse covalentemente mediante una molécula enlazadora, que puede ser un enlazador polinucleotídico o un enlazador no nucleotídico. La longitud de las hebras antisentido y con sentido es típicamente de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos cada una. Sin embargo, también pueden usarse dobles cadenas de sustrato de Dicer de ARN bicatenario (ARNbc) sintético de 25-30 nucleótidos de longitud, que se ha indicado recientemente que son más potentes que sus ARN de interferencia pequeños (ARNip) de 21 unidades convencionales correspondientes (Kim *et al.*, 2005). Típicamente, la hebra antisentido y la hebra con sentido comprenden ambas un saliente 3' terminal de pocos, típicamente 2 nucleótidos. El extremo 5' terminal del antisentido es típicamente un grupo fosfato (P). Las dobles cadenas de ARNip que tienen grupos fosfato terminales (P) son más fáciles de administrar a la célula que un antisentido monocatenario. En la célula, se forma una cadena antisentido de ARNip activa y reconoce una región diana del ARNm diana. Esto a su vez conduce a la escisión del ARN diana por el complejo de endonucleasa RISC (RISC = complejo silenciador inducido por ARN) y también en la síntesis de ARN adicional mediante ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), que puede activar DICER y dar como resultado moléculas bicatenarias de ARNip adicionales, amplificando de este modo la respuesta.

Uno de los retos relacionados con ARN de interferencia pequeños es la identificación de un ARNip potente para el ARNm correspondiente. Debería observarse que los genes con complementariedad incompleta están regulados negativamente de forma involuntaria por el ARNip, lo que conduce a problemas en la interpretación de los datos y toxicidad potencial. Esto sin embargo puede abordarse parcialmente diseñando cuidadosamente los ARNip apropiados con algoritmos de diseño. Estos programas informáticos seleccionan secuencias diana dadas con un conjunto de reglas para encontrar tramos de secuencia con bajo contenido de GC, una falta de repeticiones internas, un extremo 5' rico en A/U y energía de unión libre local alta que son características que potencian el efecto silenciador de ARNip.

Para identificar agentes útiles en la presente invención, se diseñaron varios ARNip de KIAA1524 diferentes usando algoritmos comerciales y no comerciales. Para este fin, se cargó la secuencia de ADNc de longitud completa de KIAA1524 (número de referencia de GenBank NM\_020890) en programas de algoritmos de ARNip ([http://www.mwg-biotech.com/html/s\\_synthetic\\_acids/s\\_sirna\\_design.shtml](http://www.mwg-biotech.com/html/s_synthetic_acids/s_sirna_design.shtml)) y programa independiente desarrollado por: Wenwu Cuia, Jianchang Ningb, Ulhas P. Naika, Melinda K. Duncana, OptiRNAi, an RNAi design tool. Computer Methods and Programs in Biomedicine (2004) 75, 67-73). Además, se exploraron después secuencias de ARNip generadas por algoritmos mediante alineamiento de secuencias de ADN de todo el genoma (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para eliminar ARNip que no están libres de desviación de la diana. En otras palabras, todos los ARNip que tenían regiones de secuencia incluso cortas que coincidían con otros genes distintos del gen diana (KIAA1524) se consideraron inválidos para uso adicional. Este enfoque dio como resultado la

identificación de 5 ARNip potenciales representados en SEC ID N°: 2 a 6.

Los ARNip obtenidos se transfectaron después a diferentes líneas celulares y se estudió su capacidad para degradar ARNm y agotar adicionalmente la traducción de KIAA1524 al nivel proteico midiendo la cantidad de proteína KIAA1524 después del tratamiento de ARNip con anticuerpos específicos de KIAA1524 las secuencias de ARNip que proporcionaban la regulación negativa más fuerte de proteína KIAA1524 a la menor concentración usada se marcan con un asterisco en la Tabla 1.

Tabla 1. Eficacia de ARNip para regular negativamente la expresión de KIAA1524

| SEC ID N° | Secuencia                | Longitud | Eficacia |
|-----------|--------------------------|----------|----------|
| 2         | AACATCAGTGCTTCACTGATCCTT | 25       | Moderada |
| 3         | AACTGTGGTTGTGTTTGCACCTT  | 23       | Alta*    |
| 4         | GGUUGCAGAUUCUGAAUUATT    | 21       | Moderada |
| 5         | AAUGCCUUGUCUAGGAUUATT    | 21       | Baja     |
| 6         | ACCAUUGAUAUCCUUAGAATT    | 21       | Alta*    |

La presente invención se refiere por lo tanto a ARNip de KIAA1524 seleccionados del grupo que consiste en SEC ID N°: 2 a 6 y su uso como compuestos farmacéuticos. Se proporcionan ARNip preferibles representados en SEC ID N°: 2 y 4 y ARNip más preferibles representados en SEC ID N°: 3 y 6. Es obvio que en algunas aplicaciones dichos ARNip pueden ser mayores de 21-25 nucleótidos o dobles cadenas de sustrato dicer de ARNbc.

El oligonucleótido (tal como antisentido, ARNip o molécula de ribozima), cuando se use como un compuesto farmacéutico, se introducirá en una célula diana. El suministro puede conseguirse de dos maneras principalmente diferentes: 1) suministro exógeno del oligonucleótido o 2) transcripción endógena de una secuencia de ADN que codifica el oligonucleótido, cuando la secuencia de ADN se localiza en un vector.

El ARN no modificado normal tiene baja estabilidad en condiciones fisiológicas debido a su degradación por enzimas ribonucleasas presentes en la célula viva. Si el oligonucleótido se va a administrar por vía exógena, es altamente deseable modificar la molécula de acuerdo con métodos conocidos para potenciar su estabilidad contra degradación química y enzimática.

Se describen exhaustivamente en la técnica modificaciones de nucleótidos para administrar por vía exógena *in vivo*. Principalmente, puede modificarse cualquier parte del nucleótido, es decir el azúcar ribosa, la base y/o cadenas de fosfodiéster internucleotídico. Por ejemplo, la retirada del grupo 2'-OH de la unidad de ribosa para proporcionar nucleótidos de 2'-desoxirribosa da como resultado estabilidad mejorada. También se han descrito previamente otras modificaciones en este grupo: el reemplazo del grupo 2'-OH de ribosa con grupos alquilo, alquenilo, alilo, alcoialquilo, halo, amino, azido o sulfhidrido. Además pueden realizarse otras modificaciones en la unidad de ribosa: pueden emplearse ácidos nucleicos bloqueados (LNA) que contienen enlaces de metileno entre las posiciones 2' y 4' de la ribosa para crear mayor estabilidad intrínseca.

Además, el enlace fosfodiéster internucleotídico puede, por ejemplo, modificarse de modo que se reemplace uno o más oxígenos por grupos de azufre, amino, alquilo o alcoxi. Además puede modificarse la base de los nucleótidos.

Preferentemente, el oligonucleótido comprende modificaciones de uno o más grupos 2'-hidroxilo en azúcares de ribosa y/o modificaciones en uno o más enlaces fosfodiéster internucleotídicos, y/o una o más modificaciones de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) entre la posición 2' y 4' de los azúcares de ribosa.

Son modificaciones particularmente preferibles, por ejemplo, el reemplazo de uno o más de los grupos 2'-OH por 2'-desoxi, 2'-O-metilo, 2'-halo, por ejemplo fluoro o 2'-metoxietilo. Se prefieren especialmente oligonucleótidos en los que algunos de los enlaces fosfodiéster internucleotídicos también están modificados, por ejemplo reemplazados por enlaces fosforotioato.

Debería subrayarse que las modificaciones mencionadas anteriormente son solamente ejemplos no limitantes.

De acuerdo con una realización preferible, el agente útil de acuerdo con la presente invención previene o inhibe el crecimiento y proliferación tumoral inhibiendo la interacción de dicho KIAA1524 con el complejo de PP2A o con el factor de transcripción c-Myc. Como alternativa, dicho agente inhibe los efectos potenciadores del crecimiento y proliferación de KIAA1524 que no dependen de la interacción de KIAA1524 con PP2A o c-Myc.

Los resultados de los experimentos de coimmunoprecipitación de PR65 mostraron que KIAA1524 interacciona con las subunidades tanto de PR65 como de PP2Ac del complejo proteico de PP2A. Para identificar la región de KIAA1524 que media en la interacción proteína-proteína, se estudió si la delección de cualquier región en la proteína

KIAA1524 anularía su asociación con PP2A. Para este fin, se generó una serie de construcciones de delección de KIAA1524 correspondiendo cada delección a aproximadamente 50-100 aminoácidos de la secuencia codificante de proteína y se usaron para transfectar transitoriamente células HeLa. De las once delecciones de KIAA1524, KIAA1524 sin los aminoácidos entre 461-533 fue el único mutante que mostró en experimentos repetitivos unión alterada con PR65 como se demuestra por experimentos de coimmunoprecipitación. Por lo tanto, la región que abarca del aminoácido 461 al aminoácido 533 en SEC ID N°: 1 es una diana particularmente importante para nuevos compuestos terapéuticos de cáncer.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización particularmente preferida, el agente inactiva la KIAA1524 en la región que abarca del aminoácido 461 al 533 o cualquier otra región en KIAA1524 que participa en la interacción entre el complejo de PP2A y la proteína KIAA1524.

Para estudiar si el agotamiento de KIAA1524 afecta a la interacción funcional del complejo de PP2A con su sustrato c-Myc, se estudió el nivel de expresión de estado estacionario de c-Myc en extractos de células HeLa después de transfección con ARNip de KIAA1524. Como se muestra en la Figura 3A, el agotamiento inducido por ARNip de KIAA1524 dio como resultado la regulación negativa de la expresión de la proteína c-Myc en células HeLa, mientras que, como se demuestra en la Figura 3B, la expresión de ARNm de c-Myc no se vio afectada. Estos resultados indicaron que KIAA1524 regula los niveles de proteína c-Myc postranscripcionalmente. Para estudiar si la reducción de los niveles de proteína c-Myc estaba causada por desestabilización de proteínas, se examinó el efecto del agotamiento de KIAA1524 en la semivida de proteína c-Myc endógena por análisis de pulso-seguimiento. Como se describe en más detalle la Sección Experimental, el agotamiento de KIAA1524 redujo significativamente la estabilidad de la proteína c-Myc indicando de este modo que KIAA1524 es un regulador importante de la estabilidad de c-Myc.

La coimmunoprecipitación de c-Myc y KIAA1524 de extractos celulares demostró una asociación física entre estas proteínas (Figura 3D). Para dilucidar la interacción entre KIAA1524 y c-Myc adicionalmente, se produjo KIAA1524 recombinante marcado con Flag de longitud completa en células de insecto y se realizó un ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro* con la parte amino terminal fusionada con GST recombinante de c-Myc (aminoácidos 1-262 de la secuencia con el número de referencia de GenBank NP\_002458). Los resultados indicaron que GST-c-Myc 1-262 interacciona con KIAA1524, mientras que el fragmento de degradación proteolítica de GST-Myc 1-262, correspondiente al tamaño de GST-Myc 1-120 no interacciona con KIAA1524. Por lo tanto, se espera que el dominio 120-262 de c-Myc medie en la unión directa de c-Myc con KIAA1524. Dicho dominio 120-262 de c-Myc contiene 143 aminoácidos y corresponde a los aminoácidos 1-143 representados en SEC ID N°: 31.

Además del presente hallazgo de que KIAA1524 se sobreexpresa en tejidos cancerosos humanos, tales como HNSCC, cáncer de colon y cáncer de mama, se descubrió que el nivel de expresión de KIAA1524 se correlaciona con el grado del tumor. Por ejemplo, los subtipos malignos de cáncer de mama expresaron estadísticamente significativamente más KIAA1524 que los subtipos benignos. Además, los cánceres de colon con mayor grado tumoral expresaron estadísticamente significativamente más KIAA1524 que los cánceres de colon con grado menor.

La invención se ilustrará por la siguiente Sección Experimental no restrictiva.

## Sección experimental

### Resultados

#### Identificación de KIAA1524

Para identificar las proteínas que interaccionan con PP2A a partir de las células HT-1080 los inventores generaron clones celulares que sobreexpresaban de forma estable proteína PR65 marcada con TAP, una subunidad de armazón del complejo de PP2A (Figura 1A). La purificación de TAP de extractos citoplasmáticos de controles transfectados con simulación o células que expresan PR65TAP reveló varias proteínas que se copurifican con PR65TAP pero no estaban presentes en los eluatos finales de las células de control (Figura 1B). Varias de estas proteínas que interaccionan con PR65 potenciales se identificaron posteriormente por secuenciación peptídica por espectrometría de masas. Entre las proteínas identificadas del complejo PR65TAP están tanto la subunidad catalítica (PP2Ac) como las subunidades B de PP2A, validando de este modo el enfoque (Figura 1B). Además, los inventores pudieron identificar KIAA1524 como una nueva proteína asociada a PP2A potencial. KIAA1524 es una proteína citoplasmática de 90 kDa sin función celular previamente identificada (Figura 2) (Soo Hoo *et al.*, 2002). Los resultados presentados posteriormente identifican KIAA1524 como un inhibidor endógeno de PP2A regulado positivamente específicamente en cáncer.

Los resultados del análisis de coimmunoprecipitación de PR65 muestran que KIAA1524 endógena interacciona con PR65 y PP2Ac endógeno (Figura 1C). Para identificar la región en KIAA1524 que media en la interacción proteína-proteína entre KIAA1524 y el complejo de PP2A, los inventores han construido una serie de construcciones de ADNc que codifican los mutantes de delección de KIAA1524. Para este fin, se transfectó de forma transitoria una serie de construcciones de delección de KIAA1524 marcadas con Flag en células HeLa durante 48 horas, seguido de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Flag. La interacción entre los mutantes de KIAA1524 y el complejo de PP2A se evaluó por análisis de transferencia de Western de la subunidad PR65. La inmunoprecipitación de la construcción

Flag-KIAA1524 natural (KIAA1524wt) (Figura 2A) reveló una clara interacción con la proteína PR65 endógena (Figura 1D y 3A). La interacción se produjo en condiciones de rigurosidad tanto alta (NaCl 150 mM) como moderada (NaCl 300 mM). Sin embargo, un mutante de KIAA1524, sin los aminoácidos entre 461-533 (KIAA1524mut) (Figura 2A), presentó interacción muy reducida con PR65 (Figura 1D y 3A). KIAA1524mut fue el único mutante de once mutantes de delección que demostró unión alterada con PR65 en una de las condiciones de rigurosidad.

A continuación los inventores estudiaron la colocalización de PP2Ac y KIAA1524 de células cotransfectadas con construcciones de KIAA1524wt o KIAA1524mut junto con HA-PP2Ac. Como se muestra en la Figura 1E, el análisis de imágenes confocal de células transfectadas reveló la colocalización con PP2Ac y KIAA1524wt, mientras que no se observó colocalización con PP2Ac y KIAA1524mut (Figura 1E). Para estudiar el papel de KIAA1524 en la regulación de la función de PP2A, los inventores han inhibido la expresión de KIAA1524 en células HeLa usando oligos de ARN de interferencia cortos (ARNip). Resulta importante que el agotamiento de la expresión de KIAA1524 por ARNip estimuló la actividad fosfatasa de PP2A como se mide a partir de los inmunoprecipitados de PP2Ac (Figura 1F). Tomados juntos estos resultados demuestran que KIAA1524 interacciona con e inhibe la actividad catalítica del complejo de PP2A en células cultivadas. Además, los datos muestran que la interacción es estable a fuerza iónica moderada y que los aminoácidos 461-533 de KIAA1524 contienen el dominio de interacción con PP2A de KIAA1524.

#### **KIAA1524 promueve la estabilidad de la proteína c-Myc**

Para explorar con respecto a la funciones celulares no caracterizadas de KIAA1524, se compararon los perfiles de expresión génica en todo el genoma de células HeLa transfectadas con ARNip mezclado y de KIAA1524 después de 72 horas. Notablemente, solo una pequeña fracción de los genes (76 de los 26091) incluidos en el BeadChip de Expresión Humana-6 Sentrix® (Illumina Inc.), mostró una diferencia reproducible y estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , datos no mostrados) en sus niveles de expresión entre células transfectadas con ARNip mezclado y de KIAA1524 (Figura 1F). Se ha mostrado que la actividad de PP2A regula la actividad de dos factores de transcripción relevantes para transformación, p53 y c-Myc. Para caracterizar estos dos factores de transcripción en relación con el perfil de transcripción de células con KIAA1524 agotado, la lista de 76 genes afectados por el agotamiento de KIAA1524 se comparó con bases de datos de genes diana publicadas para p53 y c-Myc. Basándose en una base de datos de gen diana de p53 (<http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/targetgene/index.php>), se ha publicado que solamente 1/76 genes afectados por el agotamiento de KIAA1524 alberga un sitio de unión a p53 en su promotor o se regula transcripcionalmente por p53. Sin embargo, en comparación con una base de datos de genes diana de c-Myc (<http://www.myc-cancer-gene.org/site/mycTargetDB.asp>), se descubrió que el 16 % (12/76) de los genes afectados por agotamiento de KIAA1524 se unían a c-Myc en su región promotora. Estos hallazgos, junto con el papel publicado de la regulación de PP2A de la estabilidad de la proteína c-Myc, sugieren que KIAA1524 puede regular la función de c-Myc.

Como se ha descrito anteriormente, el antígeno t pequeño viral conduce a la estabilización de la proteína de c-Myc protegiendo la serina 62 de c-Myc de desfosforilación mediada por PP2A. Para estudiar si el agotamiento de KIAA1524 regula la expresión de c-Myc, los inventores examinaron los niveles de proteínas en estado estacionario de c-Myc mediante transferencia de western de células transfectadas con ARNip de KIAA1524 o mezclado (Scr.). El tratamiento con ARNip de KIAA1524 dio como resultado regulación negativa evidente de la expresión de la proteína c-Myc, mientras que los niveles de expresión de ARNm de c-Myc no se vieron alterados en las mismas muestras (Figura 4A y 4B). Esto implica que KIAA1524 regula los niveles de proteína c-Myc postranscripcionalmente. De hecho, el análisis del efecto del agotamiento de KIAA1524 en la semivida de la proteína c-Myc endógena reveló que mientras que en células transfectadas con ARNip mezclado aproximadamente 40% de la proteína c-Myc estaba presente en células 1 hora después del tratamiento con cicloheximida (100 mg/ml), el agotamiento de KIAA1524 redujo significativamente la estabilidad de la proteína c-Myc.

#### **KIAA1524 inhibe la actividad PP2A asociada con c-Myc**

Los resultados anteriores demuestran que KIAA1524 interacciona con el complejo de PP2A y promueve la estabilidad de c-Myc. Para estudiar si KIAA1524 inhibe de hecho la actividad PP2A asociada con c-Myc, se sometieron inmunoprecipitados de c-Myc de células transfectadas con ARNip mezclado y de KIAA1524 a un ensayo de PP2A *in vitro* usando 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato como el sustrato (Pastula *et al.*, 2003). Resulta importante que el agotamiento de KIAA1524 por ARNip aumentó notablemente la actividad de PP2A en inmunoprecipitados de c-Myc (Figura 4C). Resulta interesante que el análisis de los inmunoprecipitados reveló además que PP2Ac y c-Myc están constitutivamente en complejo entre sí y que el agotamiento de KIAA1524 no tiene efecto sobre la interacción de c-Myc-PP2Ac (Figura 4D). Juntos, estos resultados demuestran que KIAA1524 inhibe la actividad de PP2A en el complejo c-Myc-PP2A y evita la degradación proteolítica de c-Myc.

La coimmunoprecipitación de c-Myc y KIAA1524 de los extractos celulares demuestra una asociación física entre estas proteínas (Figura 4D), pero no revela si la interacción entre KIAA1524 y c-Myc es directa. Para caracterizar además la interacción de KIAA1524 con c-Myc, se usó proteína Flag-KIAA1524 purificada en un ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro* con la parte amino terminal fusionada con GST recombinante de c-Myc (aa 1-262). Los inventores descubrieron que la resina de anticuerpo-Flag coimmunoprecipitó Flag-KIAA1524 y GST-Myc recombinantes, mientras que Flag-KIAA1524 no coimmunoprecipitó con GST solamente (Figura 5A), lo que

demuestra que KIAA1524 se une directamente con el extremo amino terminal de c-Myc. Resulta interesante que KIAA1524 no coimmunoprecipitó con la delección de GST-c-Myc correspondiente a los aminoácidos 1-120 (Figura 5A). Estos resultados indican que el dominio de interacción de KIAA1524 en c-Myc está entre los aminoácidos 120-262 en c-Myc (Figura 5B).

- 5 Juntos estos experimentos proporcionan pruebas bioquímicas sólidas de que KIAA1524 inhibe la actividad de PP2A asociada con c-Myc. Además, la unión directa de KIAA1524 con el extremo amino terminal de c-Myc proporciona la explicación más factible para la selectividad observada de KIAA1524 hacia actividad PP2A asociada con c-Myc.

#### KIAA1524 es necesario para el crecimiento tumoral

- 10 Para estudiar el papel de KIAA1524 en la regulación del comportamiento de células cancerosas, los inventores transfectaron células HeLa con ARNip de KIAA1524 y estudiaron la proliferación celular tanto en un cultivo celular como en modelo de ratón *in vivo*. El papel de KIAA1524 en la regulación de la proliferación celular se analizó a continuación por ensayo de incorporación de timidina en células HeLa. En comparación con células transfectadas con ARNip mezclado, el agotamiento de KIAA1524 dio como resultado inhibición significativa de la proliferación celular 72 horas después de la transfección (Figura 6A). Sin embargo, la transfección de ARNip de KIAA1524 no indujo una fracción sub-G1 en el análisis de FACS del contenido de ADN celular (Figura 6B), ni indujo escisión de la proteína PARP (Figura 6C), lo que demuestra que el agotamiento de KIAA1524 no induce muerte celular programada.

- 20 Para evaluar la contribución de KIAA1524 en el potencial tumorigénico de células HeLa, se analizaron los efectos del agotamiento de KIAA1524 en la capacidad de estas células para formar focos densos en una monocapa, así como su capacidad para crecer de una manera independiente de anclaje. Para este fin, los inventores estudiaron en primer lugar la eficacia del agotamiento de KIAA1524 por una única transfección de ARNip 10 días después de la transfección y descubrieron que aproximadamente el 50% de la expresión de proteína KIAA1524 aún estaba reducido después de 10 días. El agotamiento de KIAA1524 anuló la formación de focos de células HeLa 10 días después de la transfección (Figura 6D) y también inhibió claramente el crecimiento independiente de anclaje de células HeLa en agar como se midió 10 días después de sembrar en placas las células en agar (Figura 6E).

- 25 Para evaluar el papel tumorigénico de KIAA1524 *in vivo*, se inyectaron por vía subcutánea células HeLa transfectadas con ARNip de KIAA1524 o mezclado durante 72 horas en ratones atímicos y se supervisó el crecimiento tumoral midiendo el tamaño de tumores palpables. Resulta importante que el agotamiento de KIAA1524 por ARNip redujo el tamaño tumoral global (Figura 6F), y dio como resultado una inhibición significativa del peso tumoral el día 27 (Figura 6G).

Tomados juntos, estos datos demuestran que la expresión de KIAA1524 es un nuevo mecanismo de mantenimiento para el fenotipo celular transformado y que KIAA1524 promueve el crecimiento tumoral *in vivo*.

#### KIAA1524 se sobreexpresa en tumores malignos humanos

- 35 Los resultados presentados anteriormente proporcionan pruebas de que KIAA1524 inhibe la degradación de c-Myc mediada por PP2A y promueve el crecimiento y proliferación de células cancerosas. Basándose en estas características, cada KIAA1524 podría ser una nueva diana farmacológica para compuestos terapéuticos de cáncer. Para cumplir con las expectativas de una proteína dirigida en terapias de cáncer, KIAA1524 debería sobreexpresarse preferentemente en tejidos cancerosos humanos. De acuerdo con el análisis por RT-PCR cuantitativa de los inventores, se expresó ARNm de KIAA1524 a niveles muy bajos (<1% de los niveles de expresión de ARNm de  $\beta$  actina) en la mayoría de las 21 muestras no malignas, con la excepción de médula ósea, próstata, testículo, cerebelo y cerebro (Figura 7A). Para comparar los niveles de proteína de KIAA1524 entre células malignas y no malignas, se inmunotransfirieron lisados celulares completos de diferentes tipos celulares con respecto a KIAA1524. De forma coherente con la Figura 7A, se detectaron niveles muy bajos de proteína KIAA1524 en queratinocitos epidérmicos humanos (HEK), MEF no tumorigénicos y fibroblastos de ratón NIH3T3 immortalizados. Sin embargo, la proteína KIAA1524 se expresó a altos niveles tanto en células HeLa como en células de fibrosarcoma HT-1080, lo que indica que la expresión de KIAA1524 puede correlacionarse con el potencial tumorigénico de las células.

- Además, se analizaron los niveles de expresión de KIAA1524 en carcinomas de células escamosas humanas de la cabeza y cuello (HNSCC). El análisis por PCR en tiempo real de ARNm de KIAA1524 mostró sobreexpresión estadísticamente significativa de KIAA1524 en 36 líneas celulares de HNSCC en comparación con queratinocitos epidérmicos normales humanos usados como un control (Figura 7B). El ARNm de KIAA1524 también se sobreexpresó en biopsias tumorales de HNSCC en comparación con tejidos de control benignos de la misma región del cuerpo (Figura 7C). Resulta importante que la tinción inmunohistoquímica de las muestras de HNSCC también confirmó mayor expresión de KIAA1524 en células tumorales en comparación con células del estroma circundantes (Figura 7D).

Finalmente, para estudiar si KIAA1524 regula los niveles de proteína c-Myc también en líneas celulares de cáncer primarias derivadas de HNSCC, se transfectaron tres líneas celulares de HNSCC diferentes con ARNip de KIAA1524 y se analizaron con respecto a expresión de c-Myc por transferencia de western. Como se muestra en la

Figura 7E, el agotamiento de KIAA1524 dio como resultado una regulación negativa evidente de los niveles de proteína c-Myc en todas las líneas celulares examinadas. Resulta importante que el análisis de inmunoprecipitados de c-Myc reveló que el agotamiento de KIAA1524 también aumentó la actividad fosfatasa de PP2A asociada con c-Myc en líneas celulares de HNSCC.

Para examinar el papel de KIAA1524 en la regulación de la proliferación celular de HNSCC, se sometieron líneas celulares UT-SCC-7 y UT-SCC-9 a transfección de ARNip de KIAA1524 y se controló la formación de focos densos de estas líneas celulares durante 10 días. En ambas líneas celulares, el agotamiento de KIAA1524 dio como resultado una reducción significativa de la formación de focos. Resulta importante que el agotamiento de KIAA1524 también redujo significativamente el crecimiento independiente de anclaje de células tanto UT-SCC-7 como UT-SCC-9 en agar blando 21 días después de la transfección. De forma coherente con la especificidad demostrada de dos ARNip de KIAA1524 en células HeLa, dos ARNip de KIAA1524 independientes produjeron una inhibición similar del crecimiento en agar blando de células UT-SCC-9.

Finalmente, para evaluar el papel de KIAA1524 con respecto al crecimiento tumoral *in vivo* de células UT-SCC, se inyectaron células tanto UT-SCC-7 como UT-SCC-9 transfectadas con KIAA1524 o ARNip mezclados en la espalda de ratones SCID. De forma coherente con todos los otros datos presentados en este trabajo que indican la importancia de KIAA1524 para el crecimiento de células malignas y progresión tumoral, solamente 3 de los 5 y 2 de los 6 ratones a los que se inyectaron células transfectadas con ARNip de KIAA1524 UT-SCC-7 y UT-SCC-9, respectivamente, desarrollaron tumores palpables el día 65 cuando se terminó el experimento. Además, el ARNip de KIAA1524 redujo el tamaño medio de los tumores con ambas de las células UT-SCC, en comparación con células transfectadas con ARNip mezclado.

Para confirmar que los resultados anteriores se limitan a HNSCC, se analizó la expresión de KIAA1524 de 43 muestras de cáncer de colon humano y 5 muestras de control de colon normal por RT-PCR. De acuerdo con los datos de HNSCC, el ARNm de KIAA1524 se sobreexpresó significativamente en tejidos de cáncer de colon humanos en comparación con tejidos de control (Figura 8A).

Además, la comparación de la expresión de ARNm de KIAA1524 con grado de tumor de cáncer de colon reveló que la expresión de KIAA1524 es significativamente mayor en tumores invasivos de grado III y grado IV en comparación con tumores no invasivos de grado II o tejido de control de colon (Figura 8B). El grado tumoral de las muestras tisulares usadas para análisis se ha determinado previamente por criterios patológicos convencionales.

Para estudiar si KIAA1524 está sobreexpresado, además de HNSCC y cáncer de colon, también en muestras de cáncer de mama, se evaluó la expresión de KIAA1524 en 159 tumores mamarios humanos previamente caracterizados y muestras de mama normales (Come *et al.*, 2006). Resulta importante que se descubrió que KIAA1524 está significativamente sobreexpresado en tumores mamarios humanos en comparación con tejido normal (Figura 9A). Cuando se comparó la expresión de KIAA1524 entre subtipos de cáncer de mama, se descubrió sobreexpresión de KIAA1524 en los tres subtipos de cáncer de mama invasivos, carcinoma ductal invasivo (IDC), carcinoma lobular invasivo (ILC) e IDC con carcinoma de comedón intraductal (IDC+ICC) (Figura 9B). Como control, los carcinomas mucinosos, que son tumores mamarios con buen pronóstico, presentaron expresión de ARNm de KIAA1524 similar a mama normal, estadísticamente menor que los tumores invasivos (Figura 9B).

Tomados juntos, estos resultados demuestran que KIAA1524 promueve el crecimiento tumoral y la proliferación de células cancerosas e indica fuertemente que la supresión de la actividad de PP2A asociada con c-Myc es al menos uno de los mecanismos moleculares por los que KIAA1524 ejerce sus efectos celulares.

## Materiales y métodos

### Anticuerpos

Se ha publicado un anticuerpo policlonal de conejo para KIAA1524 (Soo Hoo *et al.*, 2002) (generosamente proporcionado por el Dr. Chan, Universidad de Florida). Los anticuerpos para PP2Ac, PR65, Flag, HA, GST, PARP, c-Myc y Actina se obtuvieron de Santa Cruz biotechnologies inc.

### Construcciones plasmídicas

Los vectores marcados con PR65TAP PR65 $\alpha$  se amplificaron por PCR a partir de pRC/CMV.HA PR65a (una amable donación del Dr. Brian A. Hemmings, Friedrich Miescher-Institut, Basilea, Suiza) y se clonaron en el vector TAP, JW16 (Westermarck *et al.*, 2002), usando sitios XhoI y BamHI. Se construyeron construcciones Flag-KIAA1524wt con PCR a partir del ADNc de longitud completa de KIAA1524 publicado (Soo Hoo *et al.*, 2002) (proporcionado generosamente por el Dr. Chan, Universidad de Florida). Se construyó la construcción de ADNc Flag-KIAA1524mut con PCR a partir del plásmido Flag-KIAA1524wt con PCR usando los oligonucleótidos: 5'-Taatagagaaacttcagctggaatg (SEC ID N°: 80) y 5'-Gtggttaaggatcagatttgatgtgaga (SEC ID N°: 81). Todos los clones se verificaron a continuación por secuenciación de ADN.

## Muestras de pacientes

Después del consentimiento informado, se recogieron muestras tumorales de tumores retirados quirúrgicamente de HNSCC entre los años 1990-2002 en el Hospital Central de la Universidad de Turku. Se recogieron muestras normales de pacientes que se sometían a úvulo-palato-faringoplastia para un estudio de HNSCC. Se recogieron muestras de ambos sexos que variaban en edad de 29 a 87 años.

La expresión de KIAA1524 en cáncer de colon y tejido de colon normal se examinó usando un panel de ADNc de Cáncer de Colon en Tiempo Real TissueScan (HCRT101) (Origene), que contenía 43 muestras de cáncer de colon (de ambos sexos que variaban en edad de 31 a 93 años) y 5 muestras de tejidos de colon normal (de ambos sexos que variaban en edad de 37 a 91 años). Se obtuvo ARN total extraído de 21 tejidos humanos normales diferentes de BD Biosciences (Palo Alto, CA) y fue una generosa donación del Profesor Klaus Elenius, Universidad de Turku, Finlandia. Las muestras consistieron en extracciones de ARN de pacientes individuales (cerebelo, cerebro, corazón, hígado y pulmón) o de extracciones de ARN agrupadas de 2 a 84 pacientes (glándula adrenal, médula ósea, riñón, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, bazo, timo, glándula tiroidea, tráquea, útero, colon, intestino delgado y glándula mamaria).

La expresión de KIAA1524 en cáncer de mama y tejido mamario normal se examinó usando muestras tisulares previamente descritas (Come *et al.*, 2006).

## Cultivos celulares

Se establecieron líneas celulares de SCC humanas a partir de tumores primarios (UT-SCC-8), tumores recurrentes o metástasis (UT-SCC-7, UT-SCC-9) de SCC de cabeza y cuello. Se cultivaron células SCC en DMEM complementado con glutamina 6 nmol/l, aminoácidos no esenciales, penicilina 100 U/ml, 100 mg de estreptomycin y suero de ternero fetal al 10% (FCS). Se cultivaron queratinocitos epidérmicos humanos normales en Medio Basal de Queratinocitos 2 (KBM<sup>®</sup>-2) complementado con SingleQuots<sup>®</sup> (Cambrex Bioscience; Walkersville, MD, Estados Unidos). Todas las otras líneas celulares, incluyendo HT-1080, HeLa y HK293 se cultivaron en DMEM complementado con penicilina 100 U/ml, 100 mg de estreptomycin y FCS al 10%.

## Transfecciones transitorias y tratamiento de ARNip

Se transfectaron de forma transitoria células subconfluentes usando reactivo de Transfección FuGene 6 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para tratamientos con ARNip, las células se cultivaron hasta 80% de confluencia y el medio se reemplazó con DMEM sin complementos. Se prepararon oligonucleótidos de ARN bicatenarios (mezclados: 5'- UAACAAUGAGAGCACGGCTT-3' (SEC ID N°: 82) y 5'- CCUACAUCCCGAUCGAUGAUGTT-3' (SEC ID N°: 83); KIAA1524: 5'- CUGUGGUUGUGUUUGCACUTT -3' (SEC ID N°: 84) y 5'-ACCAUUGAUAUCCUUAGAATT-3' (SEC ID N°: 6); IBA) con reactivo Oligofectamine<sup>™</sup> (Invitrogen) y se añadieron a las células. Después de 4-6 horas de incubación, el medio se equilibró a FCS al 10% y se prolongó el tratamiento de ARNip durante el periodo de tiempo apropiado.

## Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

Se extrajo ARN total de células cultivadas usando reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. A partir de muestras tumorales clínicas, se extrajo ARN usando el método de ácido-tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. Para eliminar posible ADN contaminante, las muestras de ARN se trataron con 5 unidades de DNasa I (Roche). Se sintetizó ADN en una reacción que contenía 1 µg de ARN total como un molde, 0,5 µg de hexámeros aleatorios y 200 unidades de transcriptasa inversa de RNasa H menos de virus de leucemia murina de Moloney (ambos de Promega; Madison, WI, Estados Unidos), en un volumen total de 25 µl de acuerdo con el protocolo del fabricante.

## Inmunofluorescencia

24 horas después de la transfección con construcciones de ADNc HA-PP2Ac y Flag-KIAA1524, las células HeLa cultivadas en cubreobjetos de vidrio se permeabilizaron y se fijaron durante 10 minutos en PTEMF (Pipes 100 mM (pH 6,8), EGTA 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Triton X-100 0,2% y formaldehído 4%). Después de tres lavados con PBS se bloqueó la unión de anticuerpos no específica durante 30 minutos con BSA al 3% en PBS. Los cubreobjetos se incubaron después con HA y anticuerpos específicos de marcador Flag durante 1 hora a TA en BSA al 2% en PBS. Después de tres lavados, los anticuerpos unidos se visualizaron mediante incubación con Cy3 y Cy2 y anticuerpo secundario conjugado (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS, los cubreobjetos se montaron en glicerol al 50%, PBS y DABCO 2% p/v (Sigma-Aldrich). Para análisis de colocalización, se adquirieron imágenes usando un microscopio de barrido láser confocal (LSM 510, Carl Zeiss Inc.).

## Inmunoprecipitaciones y ensayos de fosfatasa

Se agitaron perlas de Sepharose-Proteína G en un tambor durante 2 horas a 4 °C con PR65, PP2Ac, anticuerpos de c-Myc o con suero preinmune de control en HEPES-KOH 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, EGTA 0,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NP-40 0,25%, inhibidores de proteasa (Roche), b-glicerolfosfato 10 mM y DTT 0,5 mM. Se realizó

inmunoprecipitación de mutantes de Flag-KIAA1524 usando resina de anticuerpo de Flag (M3, Sigma). A continuación, las perlas sedimentadas se mezclaron con lisados celulares y se incubaron durante una noche a 4 °C. A continuación las perlas sedimentadas se lavaron cuatro veces con Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 0,3 % y DTT 0,5 mM, y las proteínas unidas se analizaron por transferencia de western usando anticuerpos secundarios True-blot. Para ensayos de fosfatasa, se retuvieron inmunocomplejos en perlas y se añadieron cantidades iguales de perlas a ensayos de fosfatasa usando el kit de Ensayo de Proteína Serina/Treonina Fosfatasa con sustrato de 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (DiFMUP) (Molecular Probes, Eugene, Oregón, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para estudiar la interacción directa entre KIAA1524 y c-Myc, se expresó por baculovirus Flag-KIAA1524 en células de insecto y se purificó por afinidad hasta su homogeneidad por la resina de Flag-anticuerpo (M3, Sigma), como se ha descrito previamente (Nordlund *et al.*, 2005). Para ensayos de interacción se eluyó proteína Flag-KIAA1524 de perlas Flag-Ab usando condiciones de pH bajo. La pureza y cantidad de esta proteína KIAA1524 se analizó en cada etapa por gel SDS-page y tinción de coomassie. No se identificaron otras proteínas contaminantes en los preparados de KIAA1524. Se produjo de forma bacteriana proteína GST y se purificó por afinidad de acuerdo con protocolos convencionales y se obtuvo GST-Myc-262 de Santa Cruz Inc. Se realizó un ensayo de inmunoprecipitación incubando 1 µg de Flag-KIAA1524 inmovilizado en resina anti-Flag M3 (Sigma) con cantidades equivalentes molares de proteínas GST-c-Myc y GST solubles en 0,5 ml de tampón que contenía Tris 20 mM (pH 7,4), EDTA 0,2 mM, NaCl 0,1 M, DTT 0,5 mM e inhibidores de proteasa completos (Roche). La ausencia de PP2A de insecto en el preparado de proteína KIAA1524 se controló mediante ensayo de fosfatasa. Se usó resina anti-Flag M3 como una resina de control en todos los experimentos. Las proteínas unidas se lavaron en tampón de unión complementado con NP-40 0,2% y se hirvieron posteriormente en tampón de muestra, se resolvieron en SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con anticuerpos de GST y KIAA1524.

#### Análisis de PCR-transcripción inversa cuantitativa

Se realizó análisis por PCR-transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) cuantitativa de muestras de ADNc con cebadores específicos y sondas fluorescentes diseñadas usando el software Primer Express (PE Biosystems) para cuantificar específicamente los niveles de ARNm de KIAA1524 y  $\beta$  actina. Las secuencias de las sondas y cebadores se muestran a continuación:

##### KIAA1524:

Sonda: att gct cag cat cgc tgt caa aga act ca (SEC ID N°: 85)

Directa: aag ctc tag ccc ttg cae agg SEC ID N°: 86)

Inversa: gtc cgt gcc tct gtt tca gc (SEC ID N°: 87)

##### $\beta$ -actina:

Sonda: atg ccc tcc ccc atg cca tcc tgc gt (SEC ID N°: 88)

Directa: tca ccc aca ctg tgc cca tct acg c (SEC ID N°: 89)

Inversa: cag cgg aac cgc tca ttg cca atg g (SEC ID N°: 90)

Se llevó a cabo PCR en una solución que contenía 300 nM de cebadores (Medprobe), 200 nM de 6-FAM 5' (PE Biosystems), 12,5 µl de Mezcla Maestra de PCR TaqMan universal (PE Biosystems), y 0,5 µl de ADNc molde en un volumen final de 25 µl. Se realizó termociclación con Detector de Secuencia ABI PRISM 7700 (PE Biosystems). La ciclación se inició con 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. La acumulación de los productos de PCR específicos se detectó en tiempo real como un aumento de la fluorescencia. La fluorescencia observada se representó frente al número de ciclo para generar representaciones de amplificación y para determinar los valores de CT, es decir el número de ciclos al que la señal fluorescente excedía un valor de CT de 0,05 unidades de fluorescencia relativas. Cada determinación de un valor de CT se realizó por duplicado y se normalizó con los valores de CT de mediciones por duplicado simultáneas de la expresión de  $\beta$ -actina de las mismas muestras. El intervalo entre dos valores de CT paralelos fue de < 5% de la media en todas las mediciones. Se estimó la expresión relativa del gen analizado (gen diana) usando la fórmula: expresión relativa =  $2^{-\Delta CT}$ , en la que  $\Delta CT = CT(\text{gen diana}) - CT(\beta\text{-actina})$ . La cantidad de ARNm se expresó como el porcentaje de la cantidad de ARNm de  $\beta$ -actina después de multiplicar la expresión génica diana relativa por un factor de 100.

#### Crecimiento en agar blando, formación de focos y formación de tumores en ratón

Para el ensayo de formación de focos y crecimiento independiente de anclaje en agar blando, se tripsinizaron células HeLa y se sembraron a  $4 \times 10^5$  células en placas de 10 cm 48 horas después del tratamiento con ARNip. Se realizaron ensayos de agar blando en medio que contenía FBS al 10% como se describe en la bibliografía. Después de 9 días de incubación los cultivos se fotografiaron con doble ciego. Los números de células formadoras de colonias viables se midieron a partir de las imágenes de microscopía (aumento 5x). El número y tamaño de las colonias de cada imagen de la vista se analizaron usando software ImageJ 1.33u de NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las colonias independientes de anclaje se clasificaron de acuerdo con un número entre 200 – 10.000 píxeles.

Para ensayos de formación de focos en MEF, se sembraron en placas 200 o 500 células de los MEF transducidos de forma retroviral con  $8,3 \times 10^5$  células NIH3T3 como alimentadores por pocillo en una placa de 6 pocillos. Las

células se cultivaron durante 1-2 semanas. Las células fijadas con metanol se tiñeron con Giemsa. Se calcularon los números de focos por cada 100 células infectadas.

Para los experimentos de ratón, se inyectaron  $3 \times 10^6$  células infectadas por vía subcutánea al flanco del ratón inmunocomprometido. Se evaluó la formación de tumores a continuación cada tercer día por palpación, y se midió el tamaño de los tumores palpables por un instrumento de precisión. El experimento se terminó el día 28. Todos los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo con las directrices de cuidado animal institucional y con el permiso del comité de evaluación de ensayos animales de la Universidad de Turku, Finlandia.

#### **Análisis de transferencia de Western**

Después de la separación proteica por electroforesis en gel de SDS-PAGE las proteínas se transfirieron a membrana Immobilo-P (Millipore; Billerica, MA, Estados Unidos). Después de incubación con anticuerpos primarios y secundarios, las proteínas inmunotransferidas se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL; Amersham Biosciences).

#### **Inmunohistoquímica**

Se realizó inmunotinción de secciones tumorales incluidas en parafina y secciones tisulares de control para KIAA1524 usando dilución 1:100 de anticuerpo p90 (Soo Hoo, *et al.*, 2002) en PBS. Se realizó inmunotinción con técnica de complejo de avidina-biotina-peroxidasa (VectaStain; Vector Labs; Burlingame, CA, Estados Unidos) en combinación con diaminobencidina (DAB) y se contratiñeron con hematoxilina.

#### **Preparación de lisados para purificación por afinidad en tándem**

Se lavaron células HT-1080 que expresaban de forma estable proteína PR65TAP con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en Tampón A (Hepes 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Inhibidor de Proteasa Completo, b-glicerolfosfato 20 mM, NaF 25 mM, PMSF 0,5 mM y DTT 0,5 mM). Las células se incubaron en hielo, se agitaron vorticialmente y después se centrifugaron a 3900 rpm durante 3 minutos para obtener el lisado citoplasmático. Los extractos se ajustaron después para que contuvieran niveles similares de NaCl y NP-40 como Tampón de Unión de IgG (IBB; Tris HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 0,2%, DTT 0,5 mM). Después se cargaron los extractos ajustados en columnas de cromatografía Poly-Prep® (BioRad) que contenían sepharose IgG 4 Fast Flow (Amersham) lavada con IBB. Los extractos se incubaron durante 4 horas a 4 °C seguido de lavados de 3 x 10 ml de IBB. Las perlas se incubaron después en tampón de escisión TEV (TCB; Tris HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 0,3%, EDTA 0,5 mM, y DTT 0,5 mM) y proteasa de virus del grabado del tabaco recombinante (TEV) durante una noche a 4 °C. Se lavaron perlas de calmodulina (Stratagene) en columnas de cromatografía Poly-Prep® con Tampón de Unión a Calmodulina (CBB; b-mercaptoetanol 10 mM, Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Mg-acetato 1 mM, imidazol 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, y NP-40 0,2%). Después se recuperó el eluato de TEV de la columna y se ajustó con respecto a unión con perlas de calmodulina (4 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M y 3 ml de CBB para cada 1 ml de eluato). El eluato ajustado se incubó durante 2 horas a 4 °C y después se lava 3 x 10 ml con CBB. Las proteínas unidas a las perlas de calmodulina se recuperan después con Tampón de Elución de Calmodulina (CEB; b-mercaptoetanol 10 mM, Tris HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Mg-acetato 1 mM, imidazol 1 mM, EGTA 5 mM y NP-40 0,2%) o sirvieron en tampón de carga de SDS.

#### **Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

Las bandas proteicas de interés se escindieron del gel, se redujeron, se alquilaron y se digirieron durante una noche con tripsina como se ha descrito previamente. Los péptidos extraídos se caracterizaron por LC-MS/MS en un instrumento de trampa iónica lineal híbrido (Q-Trap, Applied Biosystems, Framingham, MA, Estados Unidos), acoplado a un sistema de HPLC nanoflow (LC Packings, San Francisco, CA, Estados Unidos). Los espectros de fragmentos peptídicos resultantes se exploraron con una base de datos proteica no redundante exhaustiva, usando Mascot. Se requería un mínimo de tres péptidos tripticos coincidentes para identificar cada proteína, y se garantizó la asignación iónica de fragmentos correcta mediante inspección manual, si fuera necesario.

#### **Análisis de expresión génica**

Se analizó ARN total extraído de células HeLa 72 horas después de la transfección con ARNip mezclado o de KIAA1524 con respecto a perfiles de expresión génica de todo el genoma por matriz de BeadChip de Expresión Humana-6 Sentrix® (Illumina Inc.). Se realizó amplificación, marcaje e hibridación de ADNc de acuerdo con las instrucciones del fabricante y procedimientos convencionales en el Centro de Micromatrices de ADN Finandés (Centro para la Biotecnología, Universidad de Turku y Universidad Académica de Åbo, Turku, Finlandia). Los datos obtenidos de la matriz se analizaron por el personal de las instalaciones principales de Bioinformática en el Centro para Biotecnología, Universidad de Turku y Universidad Académica de Åbo, Turku, Finlandia. La lista de 76 genes cuya expresión estaba significativamente alterada en respuesta al agotamiento de KIAA1524 se filtró siguiendo criterios de al menos cambio logarítmico de 0,5 en los niveles de expresión en ambos de los dos experimentos, en comparación con células transfectadas con ARNip mezclado.

## Métodos estadísticos

Para las Figuras 6G, 8A, 8B, 9A y 9B la significación estadística se determinó por ensayo de U de Mann-Whitney y para todos los otros experimentos que presentan análisis estadístico se realizó mediante ensayo de t de Student.

## Referencias

- 5 Come, C, Magnino, F., Bibeau, F., De Santa Barbara, P., Becker, F. K., Theillet, C. y Savagner, P. (2006) *Clinical Cancer Research*, 12, 5395-5402.
- Janssens, V. y Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, 353, 417-439.
- 10 Kim D. H, Behlke M. A, Rose S. D, Chang M. S, Choi S y Rossi J. J. (2005) Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*, 23, 222-226.
- Nordlund, H. R., Laitinen, O. H., Uotila, S. T., Kulmala, M., Kalkkinen, N., y Kulomaa, M. S. (2005). Production of Hev b5 as a fluorescent biotin-binding tripartite fusion protein in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 232-238.
- 15 Pastula, C, Johnson, I., Beechem, J. M., y Patton, W. F. (2003). Development of fluorescence-based selective assays for serine/threonine and tyrosine phosphatases. *Comb Chem High Throughput Screen* 6, 341-346.
- Soo Hoo, L, Zhang, J. Y. y Chan, E. K. (2002) Cloning and characterization of a novel 90 kDa 'companion' auto-antigen of p62 overexpressed in cancer. *Oncogene*, 21, 5006-5015.
- 20 Westermarck, J., Weiss, C, Saffrich, R., Kast, J., Musti, A. M., Wessely, M., Ansorge, W., Seraphin, B., Wilm, M., Valdez, B. C. y Bohmann, D. (2002) The DEXD/H-box RNA helicase Rhl1/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *EMBO J*, 21, 451-460.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W. C., Stukenberg, P. T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, C. M., Nevins, J. R., Means, A. R. y Sears, R. (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol*, 6, 308-318.
- 25 Zhao, J. J., Roberts, T. M. y Hahn, W. C. (2004) Functional genetics and experimental models of human cancer. *Trends Mol Med*, 10, 344-350.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Westermarck, Jukka  
 Puustinen, Pietri  
 Junttila, Melissa  
  
 <120> Uso de una proteína estimulante del crecimiento  
 10 <130> 2062658EP/DIV  
 <160> 90  
 <170> PatentIn versión 3.2  
 15 <210> 1  
 <211> 905  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 1  
  
 Met Asp Ser Thr Ala Cys Leu Lys Ser Leu Leu Leu Thr Val Ser Gln  
 1 5 10 15  
  
 Tyr Lys Ala Val Lys Ser Glu Ala Asn Ala Thr Gln Leu Leu Arg His  
 20 25 30  
  
 Leu Glu Val Ile Ser Gly Gln Lys Leu Thr Arg Leu Phe Thr Ser Asn  
 35 40 45  
  
 Gln Ile Leu Thr Ser Glu Cys Leu Ser Cys Leu Val Glu Leu Leu Glu  
 50 55 60  
  
 Asp Pro Asn Ile Ser Ala Ser Leu Ile Leu Ser Ile Ile Gly Leu Leu  
 65 70 75 80  
  
 Ser Gln Leu Ala Val Asp Ile Glu Thr Arg Asp Cys Leu Gln Asn Thr  
 85 90 95  
  
 Tyr Asn Leu Asn Ser Val Leu Ala Gly Val Val Cys Arg Ser Ser His  
 100 105 110  
  
 Thr Asp Ser Val Phe Leu Gln Cys Ile Gln Leu Leu Gln Lys Leu Thr  
 115 120 125  
  
 Tyr Asn Val Lys Ile Phe Tyr Ser Gly Ala Asn Ile Asp Glu Leu Ile  
 130 135 140  
  
 Thr Phe Leu Ile Asp His Ile Gln Ser Ser Glu Asp Glu Leu Lys Met  
 145 150 155 160  
  
 Pro Cys Leu Gly Leu Leu Ala Asn Leu Cys Arg His Asn Leu Ser Val  
 165 170 175  
  
 Gln Thr His Ile Lys Thr Leu Ser Asn Val Lys Ser Phe Tyr Arg Thr  
 180 185 190

# ES 2 429 131 T3

Leu Ile Thr Leu Leu Ala His Ser Ser Leu Thr Val Val Val Phe Ala  
 195 200 205  
 Leu Ser Ile Leu Ser Ser Leu Thr Leu Asn Glu Glu Val Gly Glu Lys  
 210 215 220  
 Leu Phe His Ala Arg Asn Ile His Gln Thr Phe Gln Leu Ile Phe Asn  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Ile Asn Gly Asp Gly Thr Leu Thr Arg Lys Tyr Ser Val Asp  
 245 250 255  
 Leu Leu Met Asp Leu Leu Lys Asn Pro Lys Ile Ala Asp Tyr Leu Thr  
 260 265 270  
 Arg Tyr Glu His Phe Ser Ser Cys Leu His Gln Val Leu Gly Leu Leu  
 275 280 285  
 Asn Gly Lys Asp Pro Asp Ser Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu Leu Leu  
 290 295 300  
 Ala Phe Cys Ser Val Thr Gln Leu Arg His Met Leu Thr Gln Met Met  
 305 310 315 320  
 Phe Glu Gln Ser Pro Pro Gly Ser Ala Thr Leu Gly Ser His Thr Lys  
 325 330 335  
 Cys Leu Glu Pro Thr Val Ala Leu Leu Arg Trp Leu Ser Gln Pro Leu  
 340 345 350  
 Asp Gly Ser Glu Asn Cys Ser Val Leu Ala Leu Glu Leu Phe Lys Glu  
 355 360 365  
 Ile Phe Glu Asp Val Ile Asp Ala Ala Asn Cys Ser Ser Ala Asp Arg  
 370 375 380  
 Phe Val Thr Leu Leu Leu Pro Thr Ile Leu Asp Gln Leu Gln Phe Thr  
 385 390 395 400  
 Glu Gln Asn Leu Asp Glu Ala Leu Thr Arg Lys Lys Cys Glu Arg Ile  
 405 410 415  
 Ala Lys Ala Ile Glu Val Leu Leu Thr Leu Cys Gly Asp Asp Thr Leu  
 420 425 430  
 Lys Met His Ile Ala Lys Ile Leu Thr Thr Val Lys Cys Thr Thr Leu  
 435 440 445  
 Ile Glu Gln Gln Phe Thr Tyr Gly Lys Ile Asp Leu Gly Phe Gly Thr  
 450 455 460  
 Lys Val Ala Asp Ser Glu Leu Cys Lys Leu Ala Ala Asp Val Ile Leu

ES 2 429 131 T3

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 465        |            |            |            | 470        |            |            |            | 475        |            |            |            | 480        |            |            |            |
| Lys        | Thr        | Leu        | Asp        | Leu<br>485 | Ile        | Asn        | Lys        | Leu        | Lys<br>490 | Pro        | Leu        | Val        | Pro        | Gly<br>495 | Met        |
| Glu        | Val        | Ser        | Phe<br>500 | Tyr        | Lys        | Ile        | Leu        | Gln<br>505 | Asp        | Pro        | Arg        | Leu        | Ile<br>510 | Thr        | Pro        |
| Leu        | Ala        | Phe<br>515 | Ala        | Leu        | Thr        | Ser        | Asp<br>520 | Asn        | Arg        | Glu        | Gln        | Val<br>525 | Gln        | Ser        | Gly        |
| Leu        | Arg<br>530 | Ile        | Leu        | Leu        | Glu        | Ala<br>535 | Ala        | Pro        | Leu        | Pro        | Asp<br>540 | Phe        | Pro        | Ala        | Leu        |
| Val<br>545 | Leu        | Gly        | Glu        | Ser        | Ile<br>550 | Ala        | Ala        | Asn        | Asn        | Ala<br>555 | Tyr        | Arg        | Gln        | Gln        | Glu<br>560 |
| Thr        | Glu        | His        | Ile        | Pro<br>565 | Arg        | Lys        | Met        | Pro        | Trp<br>570 | Gln        | Ser        | Ser        | Asn        | His<br>575 | Ser        |
| Phe        | Pro        | Thr        | Ser<br>580 | Ile        | Lys        | Cys        | Leu        | Thr<br>585 | Pro        | His        | Leu        | Lys        | Asp<br>590 | Gly        | Val        |
| Pro        | Gly        | Leu<br>595 | Asn        | Ile        | Glu        | Glu        | Leu<br>600 | Ile        | Glu        | Lys        | Leu        | Gln<br>605 | Ser        | Gly        | Met        |
| Val        | Val<br>610 | Lys        | Asp        | Gln        | Ile        | Cys<br>615 | Asp        | Val        | Arg        | Ile        | Ser<br>620 | Asp        | Ile        | Met        | Asp        |
| Val<br>625 | Tyr        | Glu        | Met        | Lys        | Leu<br>630 | Ser        | Thr        | Leu        | Ala        | Ser<br>635 | Lys        | Glu        | Ser        | Arg        | Leu<br>640 |
| Gln        | Asp        | Leu        | Leu        | Glu<br>645 | Thr        | Lys        | Ala        | Leu        | Ala<br>650 | Leu        | Ala        | Gln        | Ala        | Asp<br>655 | Arg        |
| Leu        | Ile        | Ala        | Gln<br>660 | His        | Arg        | Cys        | Gln        | Arg<br>665 | Thr        | Gln        | Ala        | Glu        | Thr<br>670 | Glu        | Ala        |
| Arg        | Thr        | Leu<br>675 | Ala        | Ser        | Met        | Leu        | Arg<br>680 | Glu        | Val        | Glu        | Arg        | Lys<br>685 | Asn        | Glu        | Glu        |
| Leu        | Ser<br>690 | Val        | Leu        | Leu        | Lys        | Ala<br>695 | Gln        | Gln        | Val        | Glu        | Ser<br>700 | Glu        | Arg        | Ala        | Gln        |
| Ser<br>705 | Asp        | Ile        | Glu        | His        | Leu<br>710 | Phe        | Gln        | His        | Asn        | Arg<br>715 | Lys        | Leu        | Glu        | Ser        | Val<br>720 |
| Ala        | Glu        | Glu        | His        | Glu<br>725 | Ile        | Leu        | Thr        | Lys        | Ser<br>730 | Tyr        | Met        | Glu        | Leu        | Leu<br>735 | Gln        |
| Arg        | Asn        | Glu        | Ser<br>740 | Thr        | Glu        | Lys        | Lys        | Asn<br>745 | Lys        | Asp        | Leu        | Gln        | Ile<br>750 | Thr        | Cys        |

# ES 2 429 131 T3

Asp Ser Leu Asn Lys Gln Ile Glu Thr Val Lys Lys Leu Asn Glu Ser  
 755 760 765  
 Leu Lys Glu Gln Asn Glu Lys Ser Ile Ala Gln Leu Ile Glu Lys Glu  
 770 775 780  
 Glu Gln Arg Lys Glu Val Gln Asn Gln Leu Val Asp Arg Glu His Lys  
 785 790 795 800  
 Leu Ala Asn Leu His Gln Lys Thr Lys Val Gln Glu Glu Lys Ile Lys  
 805 810 815  
 Thr Leu Gln Lys Glu Arg Glu Asp Lys Glu Glu Thr Ile Asp Ile Leu  
 820 825 830  
 Arg Lys Glu Leu Ser Arg Thr Glu Gln Ile Arg Lys Glu Leu Ser Ile  
 835 840 845  
 Lys Ala Ser Ser Leu Glu Val Gln Lys Ala Gln Leu Glu Gly Arg Leu  
 850 855 860  
 Glu Glu Lys Glu Ser Leu Val Lys Leu Gln Gln Glu Glu Leu Asn Lys  
 865 870 875 880  
 His Ser His Met Ile Ala Met Ile His Ser Leu Ser Gly Gly Lys Ile  
 885 890 895  
 Asn Pro Glu Thr Val Asn Leu Ser Ile  
 900 905

5 <210> 2  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cadena de ARNip

<400> 2  
 aacatcagtg cttcactgat cctt 24

15 <210> 3  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cadena de ARNip

<400> 3  
 aactgtgggtt gtgtttgcac ttt 23

25 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30

|    |                                                      |    |
|----|------------------------------------------------------|----|
|    | <220><br><223> cadena de ARNip                       |    |
| 5  | <400> 4<br>gguugcagau ucugaauuat t                   | 21 |
| 10 | <210> 5<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Artificial |    |
| 15 | <220><br><223> cadena de ARNip                       |    |
| 15 | <400> 5<br>aaugccuugu cuaggauuat t                   | 21 |
| 20 | <210> 6<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Artificial |    |
| 25 | <220><br><223> cadena de ARNip                       |    |
| 25 | <400> 6<br>accauugaua uccuuagaat t                   | 21 |
| 30 | <210> 7<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial  |    |
| 35 | <220><br><223> Péptido                               |    |
| 40 | <400> 7<br>Gly Phe Gly<br>1                          |    |
| 40 | <210> 8<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial  |    |
| 45 | <220><br><223> Péptido                               |    |
| 50 | <400> 8<br>Thr Lys Val<br>1                          |    |
| 50 | <210> 9<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial  |    |
| 55 | <220><br><223> Péptido                               |    |
| 60 | <400> 9<br>Ala Asp Ser<br>1                          |    |
| 60 | <210> 10<br><211> 3                                  |    |

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Péptido  
  
 <400> 10  
 Glu Leu Cys  
 1  
  
 10 <210> 11  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Péptido  
  
 <400> 11  
 Lys Leu Ala  
 1  
 20 <210> 12  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Péptido  
  
 <400> 12  
 Ala Asp Val  
 1  
 30 <210> 13  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Péptido  
  
 <400> 13  
 Ile Leu Lys  
 1  
  
 45 <210> 14  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Péptido  
  
 <400> 14  
 Thr Leu Asp  
 1  
  
 55 <210> 15  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 15

|    |                                                      |
|----|------------------------------------------------------|
|    | Leu Ile Asn<br>1                                     |
| 5  | <210> 16<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 10 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 16<br>Lys Leu Lys<br>1                         |
| 15 | <210> 17<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 20 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 17<br>Pro Leu Val<br>1                         |
| 25 | <210> 18<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 30 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 18<br>Pro Gly Met<br>1                         |
| 35 | <210> 19<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 40 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 19<br>Glu Val Ser<br>1                         |
| 45 | <210> 20<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 50 | <220><br><223> Péptido                               |
| 55 | <400> 20<br>Phe Tyr Lys<br>1                         |
| 60 | <210> 21<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |

|    |                  |
|----|------------------|
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 5  | <400> 21         |
|    | Ile Leu Gln      |
|    | 1                |
|    | <210> 22         |
|    | <211> 3          |
| 10 | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 15 | <400> 22         |
|    | Asp Pro Arg      |
|    | 1                |
|    | <210> 23         |
|    | <211> 3          |
| 20 | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
|    | <220>            |
| 25 | <223> Péptido    |
|    | <400> 23         |
|    | Leu Ile Thr      |
|    | 1                |
| 30 | <210> 24         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 35 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 24         |
|    | Pro Leu Ala      |
|    | 1                |
| 40 | <210> 25         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 45 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 25         |
|    | Phe Ala Leu      |
|    | 1                |
| 50 | <210> 26         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
| 55 | <213> Artificial |
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 60 | <400> 26         |

Thr Ser Asp  
 1  
 <210> 27  
 <211> 3  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido  
 10  
 <400> 27  
 Asn Arg Glu  
 1  
 <210> 28  
 15 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Péptido  
 <400> 28  
 Gln Val Gln  
 1  
 25 <210> 29  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 29  
 Ser Gly Leu  
 1  
 35 <210> 30  
 <211> 2  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 30  
 Arg Ile  
 1  
 45 <210> 31  
 <211> 143  
 <212> PRT  
 50 <213> Homo sapiens  
 <400> 31

Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp  
 1 5 10 15  
 Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser  
 20 25 30  
 Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr  
 35 40 45  
 Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser Pro Asn Pro Ala Arg Gly His  
 50 55 60  
 Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn  
 85 90 95  
 Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala Ser Gln Asp Ser Ser Ala Phe  
 100 105 110  
 Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser Ser Thr Glu Ser Ser Pro Gln  
 115 120 125  
 Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His Glu Glu Thr Pro Pro Thr  
 130 135 140

<210> 32  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido

<400> 32  
 Leu Leu Gly  
 1

<210> 33  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido

<400> 33  
 Gly Asp Met  
 1

<210> 34  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido  
 <400> 34  
 Val Asn Gln  
 1  
 5  
 <210> 35  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 35  
 Ser Phe Ile  
 1  
 15  
 <210> 36  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 36  
 Cys Asp Pro  
 1  
 25  
 <210> 37  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 37  
 Asp Asp Glu  
 1  
 35  
 <210> 38  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 38  
 Thr Phe Ile  
 1  
 45  
 <210> 39  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 39  
 Lys Asn Ile  
 1  
 55  
 <210> 40

|    |                  |
|----|------------------|
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 5  | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 40         |
|    | Ile Ile Gln      |
| 10 | 1                |
|    | <210> 41         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 15 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 41         |
|    | Asp Cys Met      |
| 20 | 1                |
|    | <210> 42         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
| 25 | <213> Artificial |
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 30 | <400> 42         |
|    | Trp ser Gly      |
|    | 1                |
|    | <210> 43         |
|    | <211> 3          |
| 35 | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 40 | <400> 43         |
|    | Phe Ser Ala      |
|    | 1                |
|    | <210> 44         |
| 45 | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
|    | <220>            |
| 50 | <223> Péptido    |
|    | <400> 44         |
|    | Ala Ala Lys      |
|    | 1                |
| 55 | <210> 45         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 60 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |

|    |                  |
|----|------------------|
|    | <400> 45         |
|    | Leu Val Ser      |
|    | 1                |
| 5  | <210> 46         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 10 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 46         |
|    | Glu Lys Leu      |
|    | 1                |
| 15 | <210> 47         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 20 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 47         |
|    | Ala Ser Tyr      |
|    | 1                |
| 25 | <210> 48         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 30 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 48         |
|    | Gln Ala Ala      |
| 35 | 1                |
|    | <210> 49         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
| 40 | <213> Artificial |
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 45 | <400> 49         |
|    | Arg Lys Asp      |
|    | 1                |
|    | <210> 50         |
|    | <211> 3          |
| 50 | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 55 | <400> 50         |
|    | Ser Gly Ser      |
|    | 1                |
|    | <210> 51         |
| 60 | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |

|    |                                                      |
|----|------------------------------------------------------|
|    | <213> Artificial                                     |
|    | <220>                                                |
|    | <223> Péptido                                        |
| 5  | <400> 51<br>Pro Asn Pro<br>1                         |
| 10 | <210> 52<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 15 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 52<br>Ala Arg Gly<br>1                         |
| 20 | <210> 53<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 25 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 53<br>His Ser Val<br>1                         |
| 30 | <210> 54<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 35 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 54<br>Cys Ser Thr<br>1                         |
| 40 | <210> 55<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 45 | <220><br><223> Péptido                               |
| 50 | <400> 55<br>Ser Ser Leu<br>1                         |
| 55 | <210> 56<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 60 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 56                                             |

|    |                  |
|----|------------------|
|    | Tyr Leu Gln      |
|    | 1                |
|    | <210> 57         |
|    | <211> 3          |
| 5  | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 10 | <400> 57         |
|    | Asp Leu Ser      |
|    | 1                |
|    | <210> 58         |
| 15 | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
|    | <220>            |
| 20 | <223> Péptido    |
|    | <400> 58         |
|    | Ala Ala Ala      |
|    | 1                |
| 25 | <210> 59         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 30 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 59         |
|    | Ser Glu Cys      |
|    | 1                |
| 35 | <210> 60         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
|    | <213> Artificial |
| 40 | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
|    | <400> 60         |
|    | Ile Asp Pro      |
| 45 | 1                |
|    | <210> 61         |
|    | <211> 3          |
|    | <212> PRT        |
| 50 | <213> Artificial |
|    | <220>            |
|    | <223> Péptido    |
| 55 | <400> 61         |
|    | Ser Val Val      |
|    | 1                |
|    | <210> 62         |
|    | <211> 3          |
| 60 | <212> PRT        |

|    |                                                      |
|----|------------------------------------------------------|
|    | <213> Artificial                                     |
|    | <220>                                                |
|    | <223> Péptido                                        |
| 5  | <400> 62<br><b>Phe Pro Tyr</b><br><b>1</b>           |
|    | <210> 63                                             |
| 10 | <211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial             |
|    | <220>                                                |
| 15 | <223> Péptido                                        |
|    | <400> 63<br><b>Pro Leu Asn</b><br><b>1</b>           |
| 20 | <210> 64<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 25 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 64<br><b>Asp Ser Ser</b><br><b>1</b>           |
| 30 | <210> 65<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 35 | <220><br><223> Péptido                               |
|    | <400> 65<br><b>Ser Pro Lys</b><br><b>1</b>           |
| 40 | <210> 66<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 45 | <220><br><223> Péptido                               |
| 50 | <400> 66<br><b>ser Cys Ala</b><br><b>1</b>           |
|    | <210> 67<br><211> 3<br><212> PRT<br><213> Artificial |
| 55 | <220><br><223> Péptido                               |
| 60 | <400> 67                                             |

Ser Gln Asp  
 1  
 <210> 68  
 <211> 3  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido  
 10  
 <400> 68  
 Ser Ser Ala  
 1  
 <210> 69  
 15 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Péptido  
 <400> 69  
 Phe Ser Pro  
 1  
 25 <210> 70  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 70  
 Ser Ser Asp  
 1  
 35 <210> 71  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 71  
 Ser Leu Leu  
 1  
 45 <210> 72  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido  
 55 <400> 72  
 Ser Ser Thr  
 1  
 <210> 73  
 <211> 3  
 60 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido  
 5 <400> 73  
 Glu Ser Ser  
 1  
 <210> 74  
 <211> 3  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido  
 15 <400> 74  
 Pro Gln Gly  
 1  
 <210> 75  
 <211> 3  
 20 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido  
 25 <400> 75  
 Ser Pro Glu  
 1  
 30 <210> 76  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 76  
 Pro Leu Val  
 1  
 40 <210> 77  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Péptido  
 <400> 77  
 Leu His Glu  
 1  
 50 <210> 78  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 55 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido  
 60 <400> 78  
 Glu Thr Pro  
 1

|    |                                  |    |
|----|----------------------------------|----|
| 5  | <210> 79                         |    |
|    | <211> 3                          |    |
|    | <212> PRT                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |
| 10 | <220>                            |    |
|    | <223> Péptido                    |    |
|    | <400> 79                         |    |
|    | Pro Thr Thr<br>1                 |    |
| 15 | <210> 80                         |    |
|    | <211> 27                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |
| 20 | <220>                            |    |
|    | <223> cebador PCR                |    |
|    | <400> 80                         |    |
|    | ttaatagaga aacttcagtc tggaatg    | 27 |
| 25 | <210> 81                         |    |
|    | <211> 30                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |
| 30 | <220>                            |    |
|    | <223> Cebador PCR                |    |
|    | <400> 81                         |    |
|    | gtggtaaagg atcagatttg tgatgtgaga | 30 |
| 35 | <210> 82                         |    |
|    | <211> 20                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |
| 40 | <220>                            |    |
|    | <223> cadena de ARNip            |    |
|    | <400> 82                         |    |
|    | uaacaaugag agcacggctt            | 20 |
| 45 | <210> 83                         |    |
|    | <211> 23                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |
| 50 | <220>                            |    |
|    | <223> cadena de ARNip            |    |
|    | <400> 83                         |    |
|    | ccuacauccc gaucgaugau gtt        | 23 |
| 55 | <210> 84                         |    |
|    | <211> 21                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |
| 60 | <220>                            |    |
|    | <223> cadena de ARNip            |    |
|    | <400> 84                         |    |
|    |                                  |    |
| 65 | <210> 84                         |    |
|    | <211> 21                         |    |
|    | <212> ADN                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |

|    |                                 |    |
|----|---------------------------------|----|
|    | cugugguugu guuugcacut t         | 21 |
|    | <210> 85                        |    |
|    | <211> 29                        |    |
| 5  | <212> ADN                       |    |
|    | <213> Artificial                |    |
|    | <220>                           |    |
|    | <223> sonda de oligonucleótidos |    |
| 10 | <400> 85                        |    |
|    | attgctcagc atcgctgtca aagaactca | 29 |
|    | <210> 86                        |    |
| 15 | <211> 21                        |    |
|    | <212> ADN                       |    |
|    | <213> Artificial                |    |
|    | <220>                           |    |
| 20 | <223> Cebador PCR               |    |
|    | <400> 86                        |    |
|    | aagctctagc cctgtcacag g         | 21 |
| 25 | <210> 87                        |    |
|    | <211> 20                        |    |
|    | <212> ADN                       |    |
|    | <213> Artificial                |    |
| 30 | <220>                           |    |
|    | <223> Cebador PCR               |    |
|    | <400> 87                        |    |
| 35 | gtccgtgcct ctgttcagc            | 20 |
|    | <210> 88                        |    |
|    | <211> 26                        |    |
|    | <212> ADN                       |    |
|    | <213> Artificial                |    |
| 40 | <220>                           |    |
|    | <223> sonda de oligonucleótidos |    |
|    | <400> 88                        |    |
| 45 | atgccctccc ccatgccatc ctgcgt    | 26 |
|    | <210> 89                        |    |
|    | <211> 25                        |    |
|    | <212> ADN                       |    |
| 50 | <213> Artificial                |    |
|    | <220>                           |    |
|    | <223> Cebador PCR               |    |
| 55 | <400> 89                        |    |
|    | tcaccacac tgtgccatc tacgc       | 25 |

## ES 2 429 131 T3

<210> 90  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial  
5  
<220>  
<223> Cebador PCR  
10  
<400> 90  
cagcggaacc gctcattgcc aatgg

25

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un oligonucleótido antisentido, un ARN de interferencia pequeño (ARNip), o una ribozima que inhibe KIAA1524 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar, prevenir y/o aliviar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente previene o inhibe la proliferación y crecimiento celular inhibiendo la interacción de dicha proteína KIAA1524 con el complejo de PP2A o con el factor de transcripción c-Myc, o en el que dicho agente inhibe los efectos proliferativos y de crecimiento de KIAA1524 que no dependen de la interacción de KIAA1524 con PP2A o c-Myc.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de células escamosas de la región de cabeza y cuello, cáncer de mama y cáncer de colon.
- 10 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad hiperproliferativa se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, hipertrofia miocárdica y tumor benigno.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ARNip se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 2 a 6.

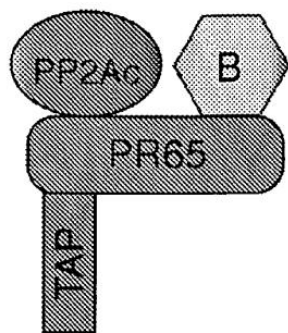


Fig. 1A

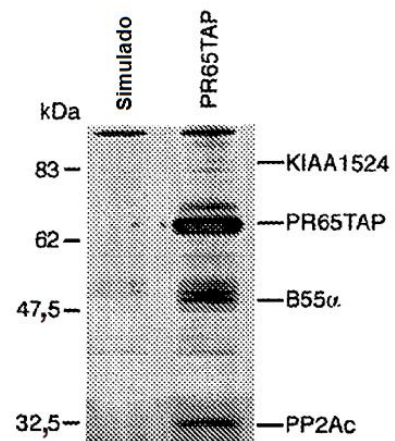


Fig. 1B

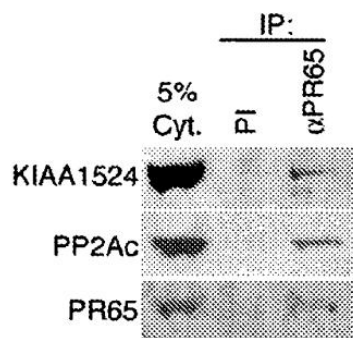


Fig. 1C

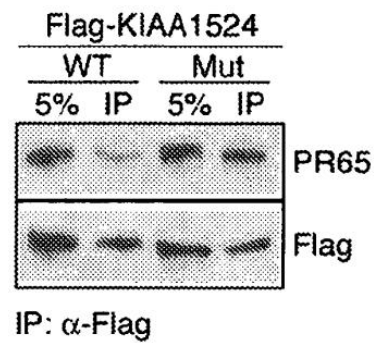


Fig. 1D

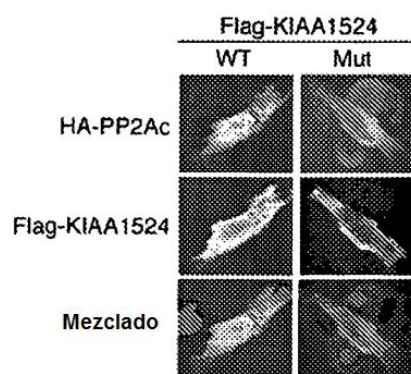


Fig. 1E

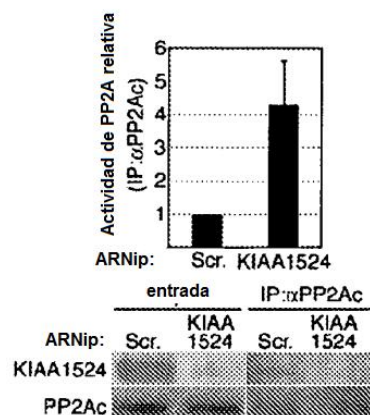


Fig. 1 F

Fig. 1

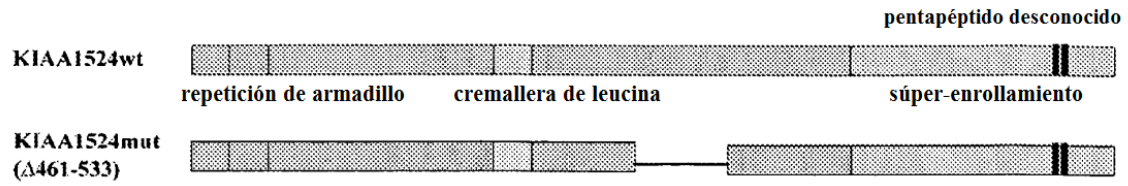


Fig. 2A

1 MDSTACKLSLLTVSQQYKAVKSEANATQLLRHLEVISGQKLTRLFTSNQILTSECLSCVELLEDPNISASLILSIIGLLSQLAVDIETRDCLQNTYNLNSVLAVVCRSSHTDSVFLQCIQLLQKLTYNVKIFYSGANIDELITFLIDHIQSSSEDELKMPCLGGLANLCRHNLSVQTHIKTLSNVKSFYRTLITLLAHSSLTVVVFA  
LSILSSSLTLNBEVGEKLFHARNIHQTFQLIFNILINGDGTLTRKYSVDLLMDLLKNPKIADYLTRYEHFSSCLHQVLGGLNGKDPDSSSKVLELLLAFCSVTQLRHMLTQMMFEQSPPGSATLGSHTKCLEPTVALLRWL  
SQPLDGSENC SVLALELFKEIFEDVIDAANCSSADRFVTLLLEPTILDQLQFTEQNLDEALTRKKCERIAK  
SIEVLLTLCGDDTLKMHIAKILTTVKCTTIEQQFTYQKIDLGFGTKVADSELCKLAADVILKTLDLINK  
LKPLVPGMEVSFYKILQDPRLITPLAFALTSDNREQVQSGLRILLEAAPLPDFPALVLGESIAANNAYRQ  
QETEHIPRKMPWQSSNHSFPTS IKCLTPHLKDGVPGLNIEELIEKLQSGMVVKDQICDVRISDIMDVYEM  
KLSTLASKESRLQDLLETALALAAQADRLIAQHRCQRTQAETEARTLASMLREVERKNEELSVLLKAQQV  
ESERAQSDIEHLFQHNKLESVAEEHEILTKSYMELLQRNESTEKKNKDLQITCDSL NKQIETVKKL NES  
LKEQNEKSIAQLIEKEEQRKEVQNQLVDREHKLANLHQKTKVQEEKIKTLQKEREDKEETIDILRKELSR  
TEQIRKELSIKASSLEVQKAQLEGRLEEKESLVKLQBEELNKHSHMIAMIHSLSGGKINPETVNLSI 905

Fig. 2B

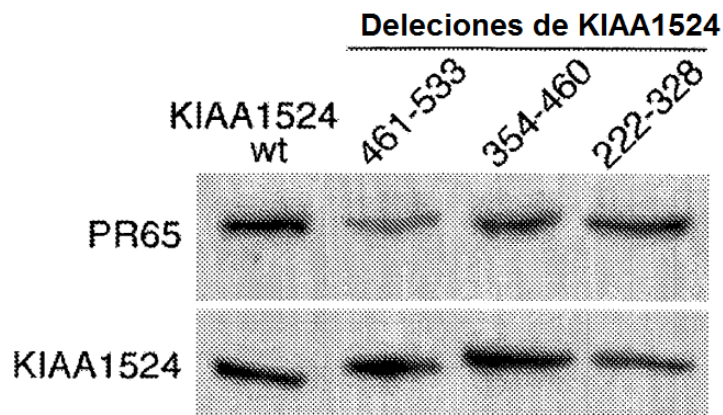


Fig. 3A

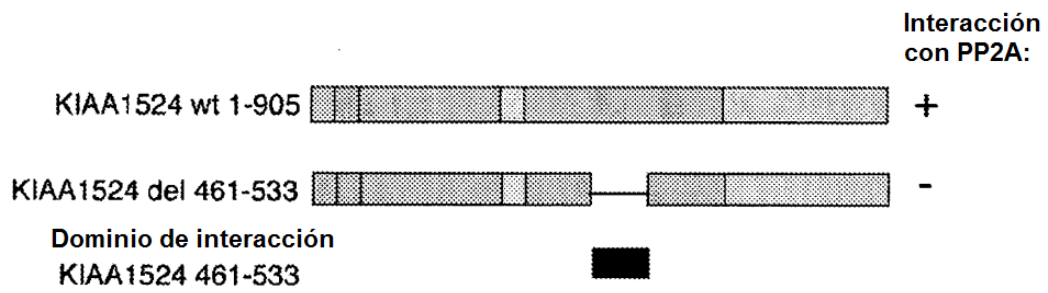


Fig. 3B

Fig. 3

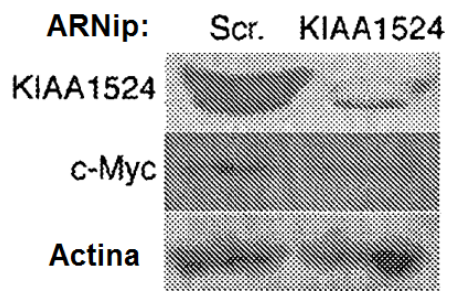


Fig. 4A

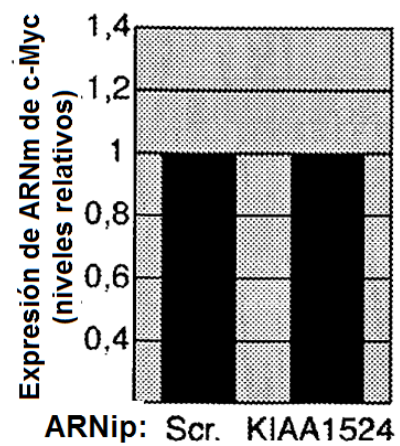


Fig. 4B

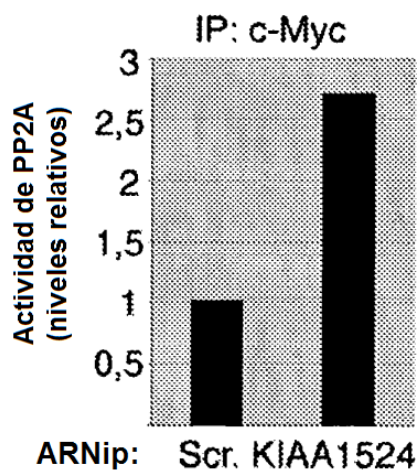


Fig. 4C

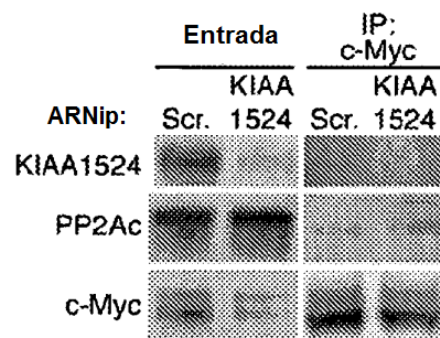


Fig. 4D

Fig. 4

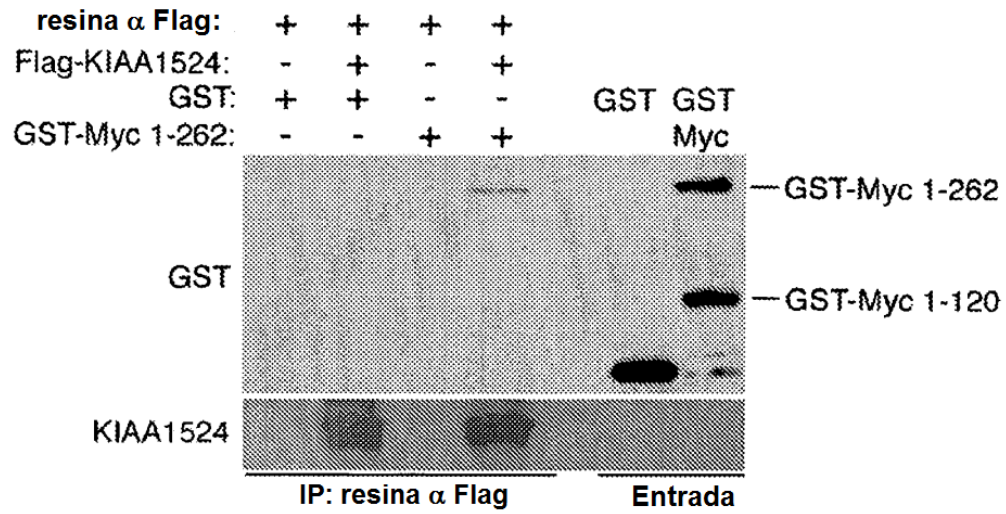


Fig. 5A

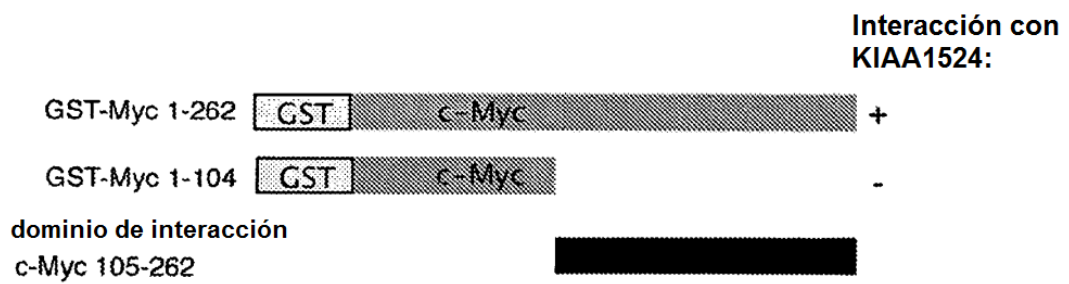


Fig. 5B

Fig. 5

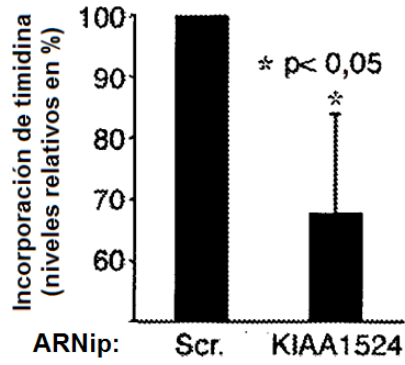


Fig. 6A

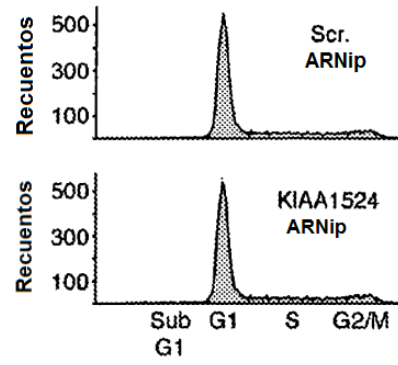


Fig. 6B

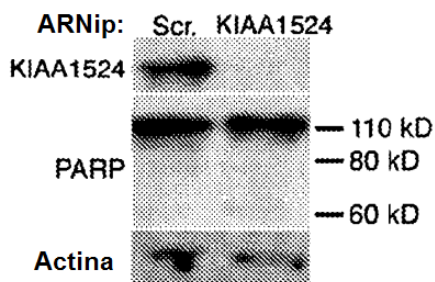


Fig. 6C

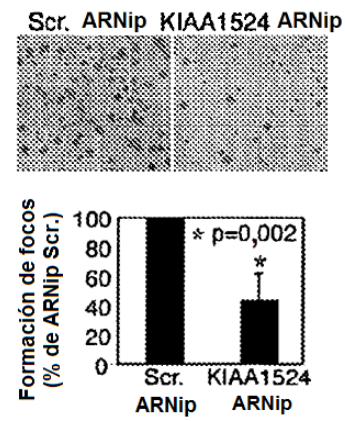


Fig. 6D

Fig. 6

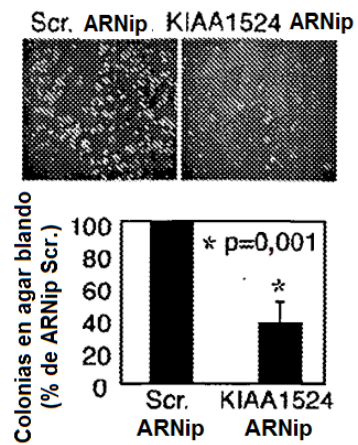


Fig. 6 E

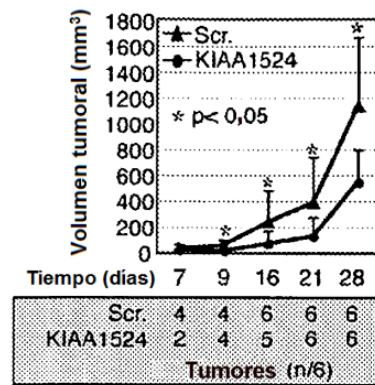


Fig. 6F

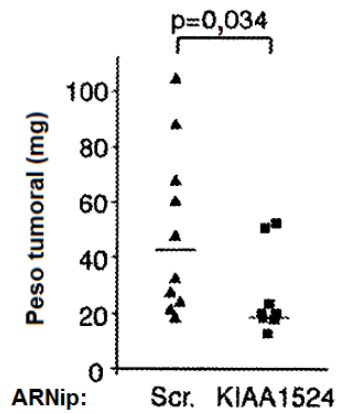


Fig. 6G

Fig. 6

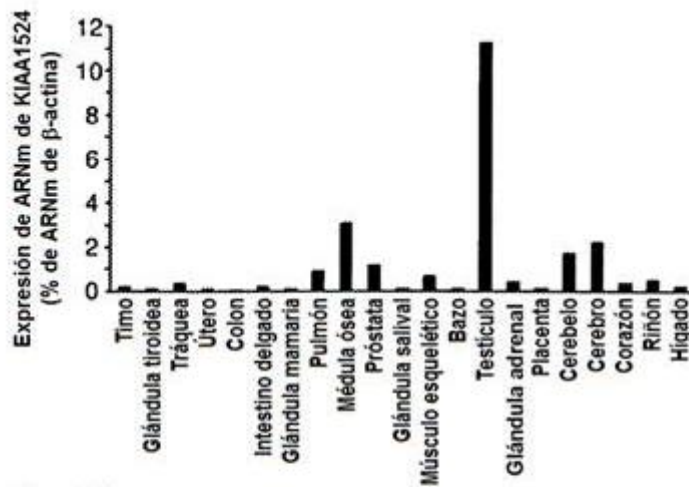


Fig. 7A

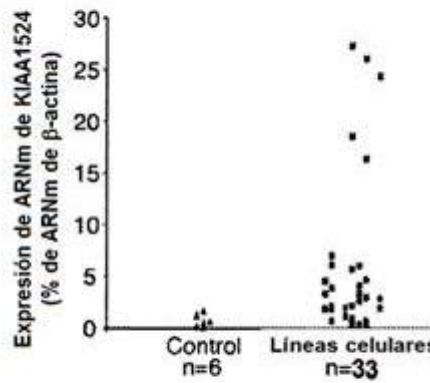


Fig. 7B

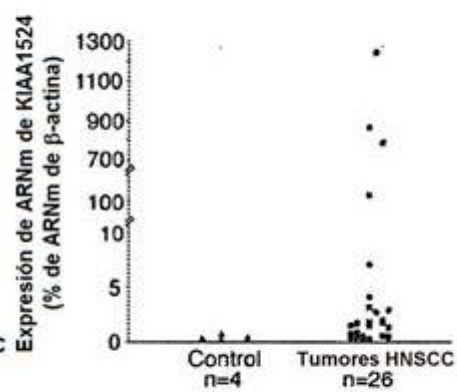


Fig. 7C

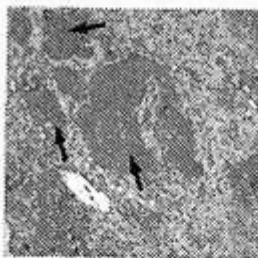


Fig. 7D

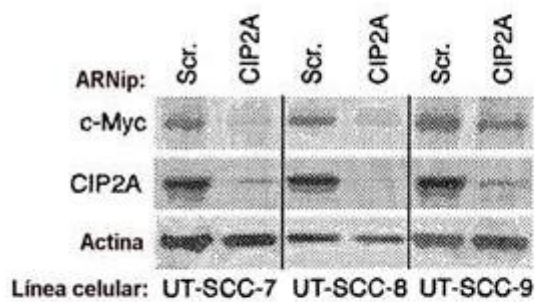


Fig. 7E

Fig. 7

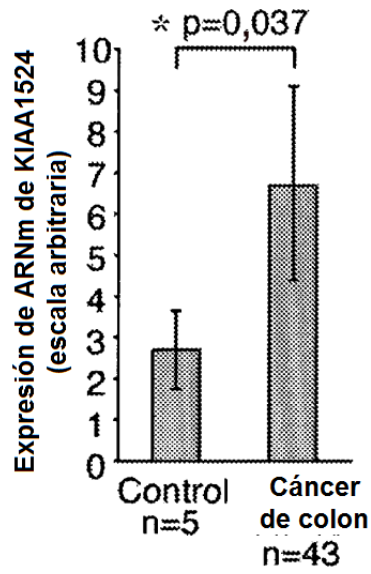


Fig. 8A

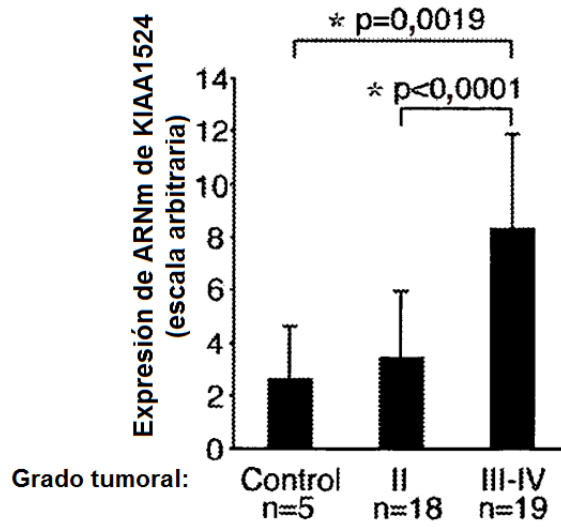


Fig. 8B

Fig. 8

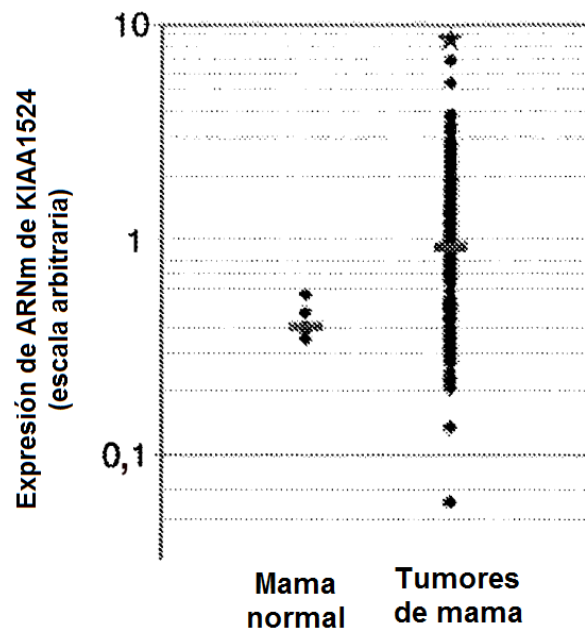


Fig. 9A

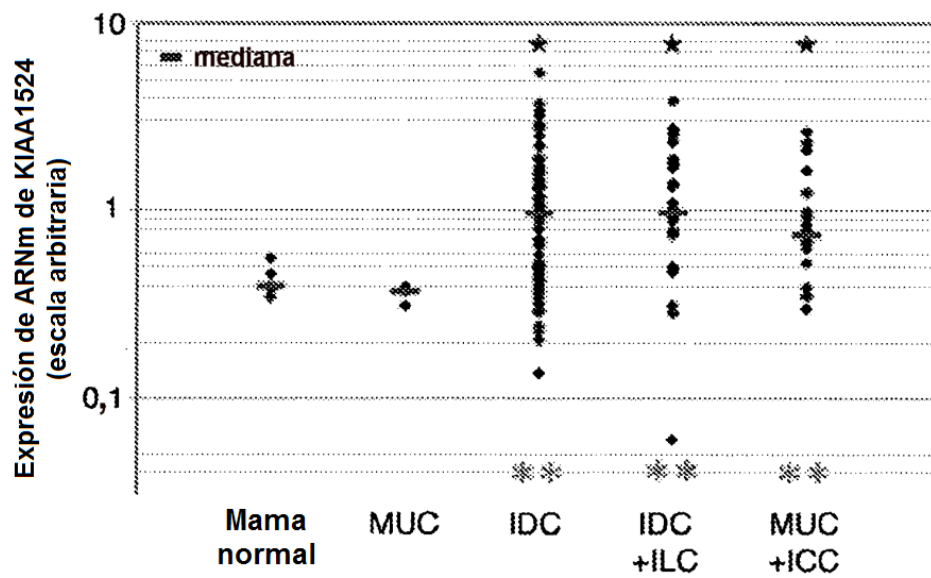


Fig. 9B

Fig. 9