

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 830**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2003 E 09000014 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2055310**

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

30 Prioridad:

14.08.2002 EP 02018572

11.09.2002 US 409570 P

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

29.03.2016

73 Titular/es:

SILENCE THERAPEUTICS GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE

72 Inventor/es:

KLIPPEL-GIESE, ANKE y
KAUFMANN, JÖRG

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 564 830 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 adicional de la proteína quinasa N beta

La presente invención se relaciona con el uso de la proteína quinasa N beta.

5 El desarrollo de fármacos modernos ya no se basa en un método más o menos heurístico sino que normalmente implica la aclaración del mecanismo molecular que subyace a una enfermedad o afección, identificación de moléculas objetivo candidatas y evaluación de dichas moléculas objetivo. Una vez que dicha molécula objetivo validada, la cual aquí también se denomina como objetivo, se encuentra disponible, se pueden probar los candidatos de fármaco relacionados con la misma. En muchos casos dichos candidatos de fármaco son miembros de una colección compuesta que puede consistir de compuestos sintéticos o naturales. También es común el uso de colecciones combinatorias. Dichas colecciones de compuesto se mencionan aquí como colecciones de compuestos candidatos. Aunque este método ha probado ser exitoso en el pasado, aún consume tiempo y dinero. Actualmente se aplican diferentes tecnologías para la identificación y validación de objetivos.

15 Aún, numerosos tumores y cánceres son una gran amenaza para la salud humana. Con el fin de crear fármacos más seguros y más poderosos que tengan menos efectos secundarios, es necesario conocer acerca de las moléculas objetivo que, luego de ser abordadas por los compuestos apropiados, se pueden influenciar específica y selectivamente en su actividad o presencia. Debido a la interacción preferiblemente selectiva y específica entre el compuesto, que puede ser un fármaco potencial o candidato, y el objetivo, se puede influenciar la función del objetivo en una enfermedad o condición de enfermedad tal como, por ejemplo, cáncer, tumorigénesis y metástasis, y de esta manera se puede tratar o evitar la enfermedad y mejorar la condición de enfermedad.

20 Por lo tanto, el problema que subyace a la presente invención es proporcionar un objetivo que sea adecuado para métodos terapéuticos en el tratamiento de tumorigénesis y cáncer. Es un problema adicional que subyace a la presente invención proporcionar un objetivo que se involucre en la tumorigénesis y metástasis.

La presente invención se define de acuerdo con las reivindicaciones proporcionadas aquí.

25 El problema que subyace a la presente invención se resuelve por el uso de la proteína quinasa N beta como un objetivo en dirección 3' de la ruta de PI 3-quinasa, preferiblemente como un objetivo de fármaco en dirección 3' de la ruta de PI 3-quinasa.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un uso de la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo.

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para uso en un método para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo.

En una realización la proteína quinasa N beta tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1.

35 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un uso de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, o un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo.

En aún un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, o para un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para uso en el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo.

40 En una realización el ácido nucleico es un ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO. 2.

Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos, pero para la degeneración del código genético, se hibridaría al ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 2.

Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia nucleica que se hibrida bajo condiciones rigurosas a la secuencia de ácidos nucleicos o parte de la misma, de acuerdo con la SEQ ID NO. 2.

45 Preferiblemente, el tumor de etapa tardía se caracteriza de tal manera que las células que están involucradas en dicho tumor de etapa tardía carecen de actividad PTEN o muestran un aumento en el comportamiento agresivo.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un ácido nucleico que inhibe un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, en donde dicha parte realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un tumor de etapa tardía, en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, una ribozima, aptámeros, espejémeros o siARN.

5 En un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de un ácido nucleico que inhibe la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, en donde dicha parte realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de tumor de etapa tardía in vivo, en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, una ribozima, aptámeros, espejémeros o siARN.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un ácido nucleico que inhibe la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, en donde dicha parte realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para uso en un método para el tratamiento de un tumor de etapa tardía, en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, una ribozima, aptámeros, espejémeros o siARN.

15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un ácido nucleico que inhibe la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para uso en un método para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo, en donde el ácido nucleico que interactúa es un oligonucleótido antisentido, una ribozima, aptámeros, espejémeros o siARN.

En otro aspecto de la invención se proporciona un método para la detección de un agente para el tratamiento de un tumor de etapa tardía y/o para la fabricación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un compuesto candidato,

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

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

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

Preferiblemente, el compuesto candidato se puede seleccionar de péptidos, proteínas, anticuerpos, anticalinos, ácidos nucleicos funcionales, compuestos naturales y moléculas pequeñas.

Los ácidos nucleicos funcionales se pueden seleccionar de aptámeros, aptazimas, ribozimas, espejémeros, oligonucleótidos antisentido y siARN.

30 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método in vitro para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía que comprende el uso de la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta.

35 En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método in vitro para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía que comprende el uso de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta.

40 Los presentes inventores han encontrado de manera sorprendente que la proteína quinasa N beta, también denominada aquí como PKN beta, es un objetivo valioso en relación con el cáncer y los tumores. Más particularmente, los presentes inventores han descubierto que la proteína quinasa N beta es un objetivo en dirección 3' de la ruta de PI-3 quinasa/PTEN. De manera aún más sorprendente los presentes inventores han descubierto que la proteína quinasa N beta está ligada a la tumorigénesis y metástasis. Particularmente, el último efecto parece estar fuertemente relacionado con la pérdida de la función supresora, más particularmente la función supresora del tumor PTEN. Como se mostrará en los ejemplos, la proteína quinasa N beta se regulará por aumento bajo condiciones en donde no está activo el PTEN que es un inhibidor de la ruta de PI-3 quinasa. Debido a la regulación por aumento de la proteína quinasa N beta, las células donde ocurre dicha regulación por aumento, mostrarán un incremento en el comportamiento metastásico y el comportamiento de migración. Esto significa que un inhibidor de la proteína quinasa N beta es un medio adecuado para controlar el comportamiento metastásico y de migración de las células y este es un medio adecuado para el tratamiento de tumores y cánceres, más par aquellos tumores y cánceres son metastásicos y de las células que muestran un comportamiento metastásico y/o de migración que son generalmente denominadas aquí como 'la enfermedad como se describe aquí' o como 'condición de enfermedad como se describe aquí'. La enfermedad como se describe aquí así como también la condición de enfermedad como se describe aquí comprende también tumorigénesis y metástasis. Esto aplica en particular a aquellas enfermedades como se describe aquí y aquellas condiciones de enfermedad como se

describe aquí, donde las células involucradas en dichas enfermedades o condiciones de enfermedad son PTEN negativas lo que significa que el PTEN supresor del tumor no está activo o tiene un nivel reducido de actividad. Las enfermedades también comprenden aquellas enfermedades en las cuales está involucrada en general la ruta de PI-3 quinasa. Además de los tumores metastásicos en particular, la diabetes pertenece a esta clase de enfermedades y condiciones de enfermedad, respectivamente. Por lo tanto, las células, en particular aquellas que están involucradas en la enfermedad o condición de enfermedad como se describe aquí y que son PTEN negativas, son susceptibles al tratamiento mediante un fármaco, con un modo de acción tal que reduce o elimina la actividad de la proteína quinasa N beta en las respectivas células involucradas. De acuerdo con esto, los pacientes cuyos tumores se caracterizan por una ruta de PI-3 quinasa preferiblemente hiperactivada, que incluye pero que no se limita a, cualquier amplificación o mutación de componentes que codifican genes de la ruta de PI-3 quinasa (p110, Akt) o son PTEN negativos o que tienen células que son PTEN negativas, particularmente si estas células están involucradas en la enfermedad tal como se describe aquí o en la condición de enfermedad como se describe aquí, se pueden tratar de manera ventajosa utilizando dichos fármacos. Dicha reducción en la actividad puede provenir de una reducción a nivel de transcripción o a nivel de traducción, es decir, la actividad enzimática de la proteína quinasa N beta. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, el último aspecto, es decir, modificar la actividad de la proteína quinasa N beta es también un resultado de una percepción de los inventores en relación con las características del PKNbeta, es decir que la actividad enzimática del PKNbeta también se puede regular por aumento y descenso, más preferiblemente regular por descenso.

Un grupo adicional de pacientes que se pueden tratar de manera ventajosa utilizando dichos fármacos son aquellos que sufren de cánceres que tienen una alta incidencia por la pérdida de la función PTEN, especialmente en tumores de etapa tardía (Cantley, L. C. and Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245; Ali, 1. U. (2000). Gatekeeper for endometrium: the PTEN tumor suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 92, 861-863). La pérdida de PTEN se correlaciona con un comportamiento agresivo e invasivo creciente de las respectivas células tumorales. En razón de esto, en las realizaciones preferidas de la presente invención aquellos agentes de diagnóstico que también se pueden utilizar como herramientas o medios analíticos en relación con los diversos aspectos de la presente invención, y agentes terapéuticos, respectivamente, dirigidos a la proteína quinasa N beta o a los ácidos nucleicos que codifican para esta, se pueden utilizar para cualquier tumor de etapa tardía siempre y cuando se cumpla el prerrequisito anteriormente mencionado, es decir, que el PTEN se correlacione con un comportamiento agresivo e invasivo creciente.

Esta clase de fármaco se puede diseñar, filtrar o elaborar sobre la base de la descripción dada aquí, a saber, que la proteína quinasa N beta es un objetivo de fármaco en dirección 3' y que la proteína quinasa N beta es un objetivo para la tumorigénesis y metástasis y enfermedades relacionadas con la misma o que surgen de esta.

En razón del involucramiento de la proteína quinasa N beta en los mecanismos destacados anteriormente, esta también se puede utilizar como un marcador para diagnosticar el estado de una célula o paciente que tiene en su cuerpo dichas clases de células si estas sufren de metástasis y tumorigénesis, respectivamente. Como un ejemplo de que esta clase de método funciona y es aplicable para ese propósito está, por ejemplo, el ICAM-1. El ICAM-1 se utiliza en el pronóstico de cánceres gástricos que sufren de metástasis (Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, Orita K., *Int. J Cancer*. 2002 Ago 1; 100(4):486-490) donde se encontraron como elevados los niveles de s-ICAM-1 en pacientes con metástasis en el hígado. En otro ejemplo, se utiliza osteopontina como un marcador de pronóstico para el cáncer de mama (Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanami M, De Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley JH, Howitt R, West CR. *Cancer Res*. 2002 Jun 15; 62(12):3417-3427). Hasta ahora la presencia o el nivel de presencia (proteína o mRNA) o el nivel de actividad de la proteína quinasa N beta se puede utilizar como marcador y cualquier compuesto que interactúe más o menos específicamente con proteína quinasa N beta será, por lo tanto, un agente de diagnóstico apropiado.

Se describirán en lo que sigue métodos y diseño principales para fármacos y agentes de diagnóstico que en cualquier caso interactúan específicamente y/o selectivamente con la proteína quinasa N beta.

A la luz de estos hallazgos, la quinasa N beta prueba ser un objetivo de fármaco en dirección 3' adecuado que permite la modulación selectiva de solo algunos aspectos que están normalmente relacionados con la ruta de PI-3 quinasa, a saber metástasis y migración, y un método de diagnóstico selectivo y específico, es decir, detección, de procesos normalmente relacionados con la ruta de PI-3 quinasa, más particularmente metástasis y migración.

La ruta de PI-3 quinasa se caracteriza por una actividad de PI-3 quinasa luego de la inducción del factor de crecimiento y una ruta de señalización paralela. La estimulación del factor de crecimiento de las células conduce a la activación de sus receptores afines en la membrana celular que a su vez se asocian y activan las moléculas de señalización intracelular tales como la PI 3-quinasa. La activación de PI 3-quinasa (que consiste de una subunidad p85 reguladora y una p110 catalítica) da como resultado la activación de Akt mediante la fosforilación, soportando de esta manera respuestas celulares tales como proliferación, supervivencia o migración adicional en dirección 3'. El PTEN es así un supresor de tumores que está involucrado en la ruta de la fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa y que se ha estudiado extensamente en el pasado por su papel para regular el crecimiento y transformación celular (para revistas, véase, Stein, R. C. and Waterfield, M. D. (2000). PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* 6, 347-357; Vazquez, F. and Sellers, W. R. (2000). The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-

kinase signaling. *Biochim Biophys Acta* 1470, M21-35; Roymans, D. and Slegers, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* 268, 487-498). El PTEN supresor de tumores funciona como un regulador negativo de la PI 3-quinasa al invertir la reacción catalizada de PI 3-quinasa y asegurar de esta manera que la activación de la ruta ocurra de una manera transitoria y controlada. La hiperactivación crónica de la señalización de PI 3-quinasa es causada por la inactivación funcional del PTEN. La actividad de PI 3-quinasa se puede bloquear mediante la adición del inhibidor de molécula pequeña LY294002. La actividad y respuestas en dirección 3' de la quinasa de señalización MEK que actúa en una ruta paralela, puede por ejemplo, ser inhibida por el inhibidor de molécula pequeña PD98059.

Una activación crónica de la ruta de PI 3-quinasa a través de la pérdida de función PTEN es un contribuyente principal a la tumorigénesis y metástasis que indica que este supresor de tumores representa un control importante para una proliferación de célula controlada. Las células modificadas PTEN muestran características similares a las células en las cuales se ha inducido de manera crónica la ruta de PI 3-quinasa por vía de las formas activadas de la PI 3-quinasa (Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P. P. (1998). El PTEN es esencial para el desarrollo embrionario y supresión de tumores. *Nat Genet* 19, 348-355. Klippel, A., Escobedo, M. A., Wachowicz, M. S., Apell, G., Brown, T. W., Giedlin, M. A., Kavanaugh, W. M. y Williams, L. T. (1998). La activación de fosfatidylinositol 3-quinasa es suficiente para la entrada de ciclo celular y promueve los cambios celulares característicos de la transformación oncogénica. *Mol Cell Biol* 18, 5699-5711. Kobayashi, M., Nagata, S., Iwasaki, T., Yanagihara, K., Saitoh, I., Karouji, Y., Ihara, S. and Fukui, Y. (1999). Dedifferentiation de adenocarcinomas by activation de phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4874-4879).

El PTEN está involucrado en varias rutas las cuales que también se denominan rutas relacionadas con PTEN tales como la ruta PI3K/PTEN, la ruta Akt, el bucle autocrino relacionado con EGF y la ruta mTOR. Una ruta de PI 3-quinasa es realmente cualquier ruta que involucra la PI 3-quinasa, directa o indirectamente. La PI 3-quinasa puede actuar como un inhibidor o como un activador en tal ruta, o ésta puede como tal ser regulada por otros elementos de la ruta.

Hay una cantidad de enfermedades y afecciones que describe la técnica anterior que involucran la ruta de PI 3-quinasa. Por razones de ilustración pero no de limitación, esta es referida a lo siguiente: cáncer del endometrio, carcinomas colorectales, gliomas, cánceres del endometrio, adenocarcinomas, hiperplasias endometriales, síndrome de Cowden, carcinoma colorrectal hereditario sin poliposis, síndrome de Li-Fraumene, cáncer de mama-ovarios, cáncer de próstata (Ali, I. U., *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, no. 11, 7 Junio 2000, pagina 861-863), síndrome de Bannayan-Zonana, LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos) (Macleod, K., supra) enfermedades de harmatoma-macrocefalia que incluyen la enfermedad de Cow (CD) y síndrome de Bannayan-Ruvalcaba- Riley (BRR), lesiones mucocutáneas (por ejemplo, triquilemonas), macrocefalia, retardo mental, harmatomas gastrointestinales, lipomas, adenomas de tiroides, enfermedad fibroquística de mama, gangliocitoma displásico del cerebelo, y enfermedades malignas de mama y tiroides (Vazquez, F., Sellers, W. R., supra)

En vista de esto, la proteína quinasa N beta es un objetivo valioso de fármaco en dirección 3' de la ruta de PI 3-quinasa N beta que se puede dirigir a fármacos que tendrán menos efectos colaterales que otros fármacos dirigidos a objetivos en dirección 5' de la proteína quinasa N beta. Hasta ahora la presente invención suministra un objetivo de fármaco que es adecuado para el diseño, filtración, desarrollo y elaboración de compuestos farmacéuticamente activos que son más selectivos que aquellos conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, LY 29402. Al tener control sobre esta fracción particular de las moléculas efectoras, es decir, la proteína quinasa N beta y cualquier molécula en dirección 3' adicional involucrada en la ruta, solo un número muy limitado de ramas paralelas de la misma u objetivos en dirección 5' adicionales en la cascada de señalización son probable que originen efectos no deseados. Por lo tanto, no estarán influenciadas las otras actividades de ruta de la PI-3 quinasa/PTEN relacionada con el ciclo celular, reparación de ADN, apoptosis, transporte de glucosa, traducción. También, la señalización de la insulina no es inducida lo que significa que de hecho se evitan las respuestas diabéticas u otros efectos colaterales observados en relación con el uso de LY294002. La LY294002 (2-(4-morfolinil)8-fenilcromona) es uno de varios inhibidores de molécula pequeña derivados de varias cromonas desarrolladas por Lilly Research Laboratories (Indianápolis) como un inhibidor para PI-3K (Vlahos et al. 1994, *JBC* 269, 5241-5248). Este se dirige a su subunidad catalítica de la molécula de PI- 3K, p110 y funciona al competir con la unión de ADP en el centro catalítico. Sin embargo, la LY294002 no puede distinguir entre diferentes isoformas de p110 (alfa, beta, delta) que se sugieren por tener diferentes funciones celulares.

La proteína quinasa N beta está también además en dirección 3' del mTOR que está dirigido por la rapamicina. El mTOR (Objetivo mamífero de la Rapamicina), también conocido como Raft o FRAP, actúa en dirección 3' de PI 3-quinasa para regular procesos tales como la entrada dependiente de quinasa pp70 S6 en el ciclo celular. El mTOR actúa como un sensor para el factor de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes para controlar la traducción a través de activar el pp70 S6 quinasa y el factor de iniciación 4E. La función del mTOR se inhibe por la rapamicina de macrólido bacteriano que bloquea el crecimiento de las células T y de ciertas células tumorales (Kuruvilla and Schreiber 1999, *Chemistry & Biology* 6, R129-R136).

El hecho de que la rapamicina y sus derivados sean fármacos adecuados que se utilizan actualmente en clínicas prueba que un objetivo de fármaco es el de más ayuda y tiene menos efectos colaterales, entre más específico sea para un

mecanismo molecular particular como, por ejemplo, se demuestra por Yu et al. (Yu, K. et al (2001) *Endocrine-RelatCanc* 8,249).

La proteína quinasa N beta es un miembro de la familia de la proteína quinasa C todas las cuales se dice que son proteína-serina/treonina quinasas. Normalmente, esta clase de proteína quinasa comprende una subunidad reguladora y una catalítica y utiliza iones de calcio y fosfolípidos como cofactores. Los diacil gliceroles actúan como un activador de esta clase de la familia de la proteína quinasa. Los miembros de la familia de la proteína quinasa C están involucrados en diversas rutas de señalización ligadas a hormonas o neurotransmisores. Estas proteínas quinasas regulan la actividad de sus proteínas objetivo mediante fosforilación. Se conoce en la técnica que la activación continua no fisiológica de la proteína quinasa C da como resultado un fenotipo celular transformado que podría conducir a la generación de cáncer.

La secuencia completa de la proteína quinasa N beta como mRNA está disponible en bancos de datos, por ejemplo, bajo los números de acceso gi 7019488 o NM.013355. Utilizando el código genético, la secuencia de aminoácidos particular se puede deducir de este mRNA. También, la secuencia de aminoácidos de la proteína quinasa N Beta está disponible en los bancos de datos bajo número de acceso gi 7019489 o NP_037487.1. La extensión de la derivación y truncamiento se pueden determinar así por un experto en la técnica mediante análisis de rutina. Cuando este llega a secuencias de ácidos nucleicos, aquellas secuencias de ácidos nucleicos también están comprendidas por el término secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína quinasa N beta que son hibridizantes para el ácido nucleico especificado por los números de acceso anteriormente mencionados o cualquier secuencia de ácidos nucleicos que se puede derivar de las secuencias de aminoácidos anteriormente mencionadas. Dicha hibridación es conocida por un experto en la técnica. Las particularidades de dicha hibridación se pueden tomar de Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. En una realización preferida, la hibridación es una hibridación bajo condiciones estrictas. Además, un ácido nucleico que codifica para una proteína quinasa N beta es también una secuencia de ácidos nucleicos que es homologa a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos anteriormente mencionadas, por medio de las cuales el grado de homología preferiblemente es 75, 80, 85, 90 o 95%. Las referencias adicionales relacionadas con la proteína quinasa N beta son, entre otras, Shibata H. et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 2001 Jul; 130 (1): 23 - 31; Dong, LQ, *Proc Natl Akad Scie USA*, 2000, May 09; 97 (10): 5089 - 5094; and Oishi, K., *Biochem Biophys Res Commun*. 1999, Aug. 11; 261 (3) : 808 - 814.

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

La secuencia de aminoácidos humanos también se puede tomar del ProtEST, número de acceso pir: JC7083 donde la respectiva proteína quinasa N beta se denomina como la proteína quinasa JC7083. El gen para la proteína quinasa N beta humana se ubica en el cromosoma humano número 9. Las fuentes de cADN para la proteína quinasa N beta son en general un número de cánceres y diversos tejidos fetales o embrionarios, más particularmente, entre otros, del estómago, adenocarcinoma, cerebro, mama, linfoma de Burkitt, linfoma, cuello del útero, condrosarcoma, colon, ojos fetales, cristalinos fetales, segmento anterior de ojo fetal, nervio óptico fetal, retina fetal, fovea de la retina fetal, corioide fetal macular fetal, fibroteoma, estirpe germinal, cabeza cuello, corazón, riñón, carcinoma de células grandes, leiomiomas condrosarcoma metastásico, ovarios, paratiroides, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células epidermoides, testículos, y útero. De esta lista es obvio que el fármaco que también se denomina aquí como medicamento, y el agente de diagnóstico, que incluye un agente de etapas, es decir, un agente que puede ser utilizado para diferenciar el estado de un paciente con relación al estado de una enfermedad de la cual podría sufrir, así como también para vigilar la efectividad de un tratamiento aplicado a un paciente, respectivamente, a ser diseñado, filtrado o elaborado de acuerdo con la enseñanza técnica dada aquí puede adicionalmente a cualquiera de las otras enfermedades como se describe aquí y las condiciones de enfermedad tal como se describe aquí ser utilizado también para el tratamiento, prevención, diagnóstico, pronóstico y vigilancia de estas enfermedades o de cualquier enfermedad que involucre las células, tejidos u órganos específicos. Estas enfermedades y condiciones de enfermedad también deben estar comprendidas por el término "enfermedad como se describe aquí".

En vista de los sorprendentes hallazgos descritos aquí, la proteína quinasa N beta como tal se puede utilizar como un medicamento para la prevención y/o tratamiento de las diversas enfermedades y condiciones de enfermedad como se describe aquí, y para la fabricación de un medicamento para dicho propósito y para la fabricación de un agente de diagnóstico.

En el caso de la proteína quinasa N beta o un fragmento o derivado de la misma como se definió anteriormente se utiliza como un medicamento en sí mismo, se utiliza preferiblemente como un competidor a la proteína quinasa N beta

de ocurrencia natural y evitando así la función biológica normal de la misma. Se prefiere particularmente que la proteína quinasa N beta utilizada para ese propósito sea catalíticamente defectuosa. Esta clase de proteína quinasa N beta se puede aplicar al organismo y célula, respectivamente, o se puede introducir en el organismo y células respectivas por medio de terapia génica.

5 Aparte de ser un fármaco potencial en sí mismo, la proteína quinasa N beta se puede utilizar como el compuesto contra el cual se dirigen los compuestos químicos que se pueden utilizar como fármacos o candidatos de fármaco o como agentes de diagnóstico. Estos compuestos químicos pertenecen a diferentes clases de compuestos tales como anticuerpos, péptidos, anticodinos, aptámeros, espiegélmeros, ribozimas, oligonucleótidos antisentido y siARN así como también moléculas pequeñas. Los compuestos se diseñan, seleccionan, filtran, generan y/o elaboran al utilizar la proteína quinasa N beta en sí misma como un entidad física o química, o información relacionada con la proteína quinasa N beta. En el proceso de diseño, selección, filtración, generación y/o fabricación de dichas clases de compuestos, la proteína quinasa N beta también se denominará como un objetivo que se utiliza en el proceso en lugar de la aplicación final del compuesto respectivo a un paciente en necesidad del mismo. En los procesos que suministran las diversas clases de compuestos, se pueden utilizar la proteína quinasa N beta, también denominada aquí como proteína quinasa N beta o un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta. El término proteína quinasa N beta como se utiliza aquí comprende cualquier fragmento o derivado de proteína quinasa N beta que permite el diseño, selección, filtración, generación y/o fabricación de dichas clases de compuestos de la(s) clase(s) respectiva(s) de compuestos que a su vez son/están después de su aplicación como un medicamento o como un agente de diagnóstico activos como tal. El término ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta como se utiliza aquí comprenderá cualquier ácido nucleico que contenga un ácido nucleico que codifique la proteína quinasa N beta como se definió anteriormente, o una parte de la misma. Una parte de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta es considerado como tal siempre y cuando este sea aún adecuado para el diseño, selección, filtración, generación y/o fabricación de dichas clases de compuestos que a su vez son/están luego de su aplicación como un medicamento o como un agente de diagnóstico activos como tal. El ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta puede ser un ácido nucleico genómico, hnARN, mARN, cADN, o parte de cada uno de ellos.

Se pueden utilizar otros medios o compuestos con el fin de crear o suprimir los efectos que surjan de la proteína quinasa N beta o de la proteína quinasa N beta que codifica el ácido nucleico. Dichos medios se pueden determinar o seleccionar en un método de filtración. En dicho método de filtración una primera etapa es suministrar uno o varios de los así llamados compuestos candidatos. Los compuestos candidatos como se utilizan aquí son compuestos cuya idoneidad debe ser ensayada en un sistema de ensayo para tratar o aliviar las diversas enfermedades como se describieron aquí y las condiciones de enfermedad como se describieron aquí o ser utilizadas como un medio o agente de diagnóstico para esta clase de enfermedades y condiciones de enfermedad. Si un compuesto candidato muestra un efecto respectivo en un sistema de ensayo dicho compuesto candidato es un medio o agente adecuado para el tratamiento de dichas enfermedades y condiciones de enfermedad y, en principio, también un agente de diagnóstico adecuado para dichas enfermedades y condiciones de enfermedad. En una segunda etapa, el compuesto candidato se pone en contacto con un sistema de expresión de proteína quinasa N beta o un producto génico de la proteína quinasa N beta, preferiblemente un producto de expresión génica, tal como el hnARN o mARN, o un sistema de actividad de proteína quinasa N beta o una proteína quinasa N beta. El sistema de actividad de proteína quinasa N beta también se denomina aquí como y/o también es preferiblemente activo en el significado de un sistema que detecta la actividad de la proteína quinasa N beta.

Un sistema de expresión de la proteína quinasa N beta es básicamente un sistema de expresión que muestra o despliega la expresión de proteína quinasa N beta, por medio del cual básicamente se puede cambiar la extensión o nivel de expresión. Preferiblemente, el sistema de actividad de proteína quinasa N beta es esencialmente un sistema de expresión por medio del cual la actividad o condición de actividad se mide en lugar de la expresión de proteína quinasa N beta. Alternativamente, un sistema de actividad de quinasa de proteína es una proteína quinasa N beta cuya actividad se puede medir o un sistema que suministra o comprende la proteína quinasa N beta. En cualquiera de estos sistemas se ensaya si bajo la influencia de un compuesto candidato la actividad de proteína quinasa N beta o del ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta es diferente de la situación sin el compuesto candidato. Sin importancia el sistema particular es un sistema de expresión o un sistema de actividad, está dentro del alcance de la presente invención que un incremento o disminución de la actividad y expresión, respectivamente, pueda ocurrir y ser medidos. Normalmente, el sistema de expresión y/o el sistema de actividad es una reacción in vitro, tal como un extracto celular o un fragmento del extracto celular tal como un extracto de núcleo. Un sistema de expresión de proteína quinasa N beta como se utiliza aquí también puede ser una célula, preferiblemente una célula o un tejido u órgano involucrado en las enfermedades como se describieron aquí y las condiciones de enfermedad como se describen aquí.

55 Si existe un incremento o disminución en el sistema de actividad o en el sistema de expresión se puede determinar en cada nivel de la expresión, por ejemplo al medir el incremento o disminución de la cantidad de ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, más particularmente el mARN o el incremento o disminución de la proteína quinasa N beta expresada bajo la influencia del compuesto candidato. Las técnicas requeridas para la medición, más particularmente la medición cuantitativa de esta clase de cambios, tales como para el mARN o la proteína son conocidas por el experto en la técnica. También se conocen por el experto en la técnica los métodos para determinar la cantidad o contenido de la proteína quinasa N beta, por ejemplo, mediante el uso de los anticuerpos apropiados. Los

anticuerpos se pueden generar como se conoce por un experto en la técnica y se describe, por ejemplo, en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

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

- 5 Poner en contacto el compuesto candidato y el sistema de expresión y el sistema de actividad, respectivamente, normalmente se realiza al agregar una solución acuosa del compuesto candidato a un sistema de reacción respectivo que se denomina generalmente aquí como sistema de ensayo. Además de las soluciones acuosas también se pueden utilizar suspensiones o soluciones del compuesto candidato en solventes orgánicos. La solución acuosa preferiblemente es una solución reguladora.
- 10 Preferiblemente, en cada serie que utiliza el sistema de expresión y el sistema de actividad, respectivamente, solamente se utiliza un compuesto candidato único. Sin embargo, está dentro de la presente invención que diversas de estas clases de ensayo se efectúan en paralelo en un sistema de alto rendimiento.

15 Una etapa adicional en el método de acuerdo con la presente invención reside en determinar si bajo la influencia del compuesto candidato se cambia la expresión o actividad del sistema de expresión y el sistema de actividad, respectivamente, con relación a la proteína quinasa N beta o el ácido nucleico que la codifica. Normalmente esto se realiza al comparar la reacción del sistema luego de la adición del compuesto candidato con relación a aquel sin la adición del compuesto candidato. Preferiblemente, el compuesto candidato es un miembro de una colección de compuestos. Básicamente cualquier colección de compuestos es adecuada para el propósito de esta invención sin importar la clase de compuestos. Las colecciones de compuestos adecuadas, entre otras, son las colecciones

20 compuestas de moléculas pequeñas, de péptidos, proteínas, anticuerpos, anticalinos y ácidos nucleicos funcionales. Estos últimos compuestos se pueden generar como lo sabe el experto en la técnica y como se subraya aquí.

La fabricación de un anticuerpo específico para la proteína quinasa N beta o para el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, es conocido por el experto en la técnica y, por ejemplo, se describe en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988). Preferiblemente, se

25 pueden utilizar anticuerpos monoclonales en relación con la presente invención que se pueden fabricar de acuerdo con el protocolo de Cesar y Milstein y los desarrollos adicionales basados en el mismo. Los anticuerpos como se utilizan aquí, incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o derivados tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc, y anticuerpos de cadena única, en tanto que sean adecuados y capaces de unirse a la proteína quinasa N beta. Aparte de los anticuerpos monoclonales también se pueden utilizar y/o generar anticuerpos

30 policlonales. La generación de anticuerpos policlonales también es conocida por el experto en la técnica y, por ejemplo, se describe en Harlow, E., y lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988). Preferiblemente, los anticuerpos utilizados para los propósitos terapéuticos son anticuerpos humanizados o humanos como se definió anteriormente.

Los anticuerpos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención pueden tener uno o varios marcadores o

35 etiquetas. Dichos marcadores o etiquetas pueden ser útiles para detectar el anticuerpo en su aplicación diagnóstica o en su aplicación terapéutica. Preferiblemente, los marcadores y las etiquetas se seleccionan del grupo que comprende avidina, estreptavidina, biotina, oro y fluoresceína y se utiliza, por ejemplo, en métodos de ELISA. Estos marcadores y marcadores adicionales así como también los métodos, por ejemplo, se describen en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

40 También está dentro de la presente invención que la etiqueta o marcador exhiba una función adicional aparte de la detección, tal como la interacción con otras moléculas. Dicha interacción puede ser, por ejemplo, interacción específica con otros compuestos. Estos otros compuestos pueden ser aquellos inherentes al sistema donde el anticuerpo se utiliza tal como el cuerpo humano o animal o la muestra que se analiza al utilizar el respectivo anticuerpo. Los marcadores

45 apropiados, por ejemplo, pueden ser biotina o fluoresceína con los compañeros de interacción específicos de los mismos tales como avidina y estreptavidina y los similares, que están presentes en el respectivo compuesto o estructura para interactuar con los anticuerpos así marcados o etiquetados.

Una clase adicional de medicamentos así como también agentes de diagnóstico que se pueden generar utilizando la proteína de la proteína quinasa N beta o el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa beta, son péptidos que se unen a la misma. Se pueden generar dichos péptidos al utilizar métodos de acuerdo con el estado en la técnica tal como

50 exhibición de fagos. Básicamente, se genera una colección de péptidos, tal como en forma de fagos, y esta clase de colecciones se pone en contacto con la molécula objetivo, en el presente caso, por ejemplo, la proteína quinasa N beta. Aquellos péptidos que se unen a la molécula objetivo posteriormente se retiran, preferiblemente como un complejo con la molécula objetivo, de la respectiva reacción. Un experto en la técnica sabe que las características de unión, por lo menos en una cierta proporción, dependen de la configuración experimental particularmente efectuada tal como la

55 concentración de sal y similares. Después de separar aquellos péptidos que se unen a la molécula objetivo con una mayor afinidad o una fuerza más grande, de los miembros no ligantes de la colección, y opcionalmente también después de la eliminación de la molécula objetivo del complejo de la molécula objetivo y el péptido, se puede(n)

caracterizar posteriormente el (los) péptido(s) respectivo(s). Antes de la caracterización opcionalmente se efectúa una etapa de amplificación tal como, por ejemplo, al propagar los fagos que codifican el péptido. La caracterización comprende preferiblemente la secuenciación de los péptidos de unión objetivo. Básicamente, los péptidos no se limitan en sus longitudes, sin embargo, preferiblemente los péptidos que tienen longitudes desde aproximadamente 8 hasta 20 aminoácidos se obtienen preferiblemente en los respectivos métodos. El tamaño de las colecciones puede ser aproximadamente 10^2 a 10^{18} , preferiblemente 10^8 a 10^{15} diferentes péptidos, sin embargo, no se limitan a estos.

Una forma particular de polipéptidos que se unen a un objetivo son los así llamados "anticalinos" que, entre otros, se describen en la solicitud de patente Alemana DE 197 42 706.

La proteína de la proteína quinasa N beta así como también el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta se puede utilizar como el objetivo para la fabricación o desarrollo de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades descritas aquí y de las condiciones de enfermedad descritas aquí, así como también para la fabricación y/o desarrollo de medios para el diagnóstico de dichas enfermedades y dichas condiciones, en un proceso de filtración, por medio del cual en el proceso de filtración se utilizan moléculas pequeñas o colecciones de moléculas pequeñas. Esta filtración comprende la etapa de poner en contacto la molécula objetivo con una molécula pequeña única o una variedad de moléculas pequeñas al mismo tiempo o posteriormente, preferiblemente aquellas provenientes de la colección como se especificó anteriormente, e identificar aquellas moléculas pequeñas o miembros de la colección que se unen a las moléculas objetivo las cuales, si se filtran en relación con otras moléculas pequeñas se pueden separar de las moléculas pequeñas no ligantes o no interactuantes. Se puede reconocer que la unión y no unión pueden estar fuertemente influenciadas por la configuración experimental particular. Para modificar la exigencia de los parámetros de reacción es posible variar el grado de unión y no unión que permite la sintonía fina de este proceso de filtración. Preferiblemente, después de la identificación de una o varias moléculas pequeñas que interactúan específicamente con la molécula objetivo, se puede caracterizar adicionalmente esta molécula pequeña. Esta caracterización adicional puede, por ejemplo, residir en la identificación de la molécula pequeña y la determinación de su estructura molecular y características físicas, químicas, biológicas y/o médicas adicionales. Preferiblemente, los compuestos naturales tienen un peso molecular de aproximadamente 100 a 1000 Da. También, preferiblemente, las moléculas pequeñas son aquellas que cumplen con las reglas de Lepinsky de cinco conocidas por aquellos expertos en la técnica. Alternativamente, las moléculas pequeñas también se pueden definir de tal manera que sean moléculas pequeñas sintéticas, que surgen preferiblemente de la química combinatoria, en contraste con los productos naturales que preferiblemente no son sintéticos. Sin embargo, se debe notar que estas definiciones son solo subsidiarias del entendimiento general de los respectivos términos en la técnica.

También está dentro de la presente invención utilizar la proteína quinasa N beta y/o un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta como una molécula objetivo para la fabricación o selección de aptámeros y espiegélmeros que luego se pueden utilizar directamente o indirectamente como medicamentos o agentes de diagnóstico.

Los aptámeros son ácidos nucleicos D que son de cadena sencilla o doble y que interactúan específicamente con una molécula objetivo. La fabricación o selección de aptámeros, por ejemplo, se describe en la patente Europea EP 0 533 838. Básicamente se efectúan las siguientes etapas. Primero, se suministra una mezcla de los ácidos nucleicos, es decir, los aptámeros potenciales, por medio de los cuales cada ácido nucleico comprende normalmente un segmento de diversos, preferiblemente por lo menos ocho nucleótidos posteriormente aleatorizados. La mezcla posteriormente se pone en contacto con la molécula objetivo por medio de la cual el(los) ácido(s) nucleico(s) se une(n) a la molécula objetivo, tal como la basada en una afinidad creciente hacia el objetivo o con una mayor fuerza a esta, en comparación con la mezcla candidata. El(los) ácido(s) nucleico(s) de unión se separa/n posteriormente del resto de la mezcla. Opcionalmente, el(los) ácido(s) nucleico(s) así obtenido(s) se amplifican utilizando, por ejemplo, reacción de cadena de polimerasa. Estas etapas se pueden repetir varias veces dando al final una mezcla que tiene una relación creciente de ácidos nucleicos que se unen específicamente al objetivo del cual luego se selecciona opcionalmente el ácido nucleico de unión final. Estos ácidos nucleicos de unión específica son denominados aptámeros. Es obvio que en cualquier etapa del método para la generación o identificación de las muestras de aptámeros de la mezcla de ácidos nucleicos individuales se puede tomar para determinar la secuencia de las mismas que utilizan técnicas estándar. Está dentro de la presente invención que los aptámeros se puedan estabilizar, tal como, por ejemplo, al introducir los grupos químicos definidos que son conocidos por aquellos expertos en la técnica para generar aptámeros. Dicha modificación puede por ejemplo residir en la introducción de un grupo amino en la posición 2' de la porción de azúcar de los nucleótidos. Los aptámeros se utilizan actualmente como agentes terapéuticos. Sin embargo, está dentro de la presente invención que los aptámeros así seleccionados o generados se puedan utilizar para la validación de objetivos y/o como una sustancia líder para el desarrollo de medicamentos, preferiblemente de medicamentos a base de moléculas pequeñas. Esto de hecho se hace mediante un ensayo de competición por medio del cual la interacción específica entre la molécula objetivo y el aptámero se inhibe por un fármaco candidato por lo cual luego del reemplazo del aptámero del complejo de objetivo y aptámero se puede asumir que el respectivo candidato a fármaco permite una inhibición específica de la interacción entre el objetivo y el aptámero, y si la interacción es específica, dicho fármaco candidato, por lo menos en principio, será adecuado para bloquear el objetivo y así disminuir su disponibilidad o actividad biológica en un sistema respectivo que comprenda dicho objetivo. La molécula pequeña así obtenida puede entonces estar sujeta a una derivación y modificación adicional para optimizar sus características físicas, químicas, biológicas y/o médicas tales como toxicidad, especificidad, biodegradabilidad y biodisponibilidad.

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

Una clase adicional de compuestos que se pueden fabricar o generar con base en la proteína quinasa N beta o un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa beta, como la molécula objetivo como se describe aquí, son las ribozimas, oligonucleótidos antisentido y siARN.

Es una característica común de todos los ácidos nucleicos anteriormente mencionados que no interactúan con la molécula objetivo al nivel del producto de traducción que a su vez está presente en el caso de la proteína quinasa N beta, sino que por el contrario interactúan con el producto de transcripción, es decir, el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa beta tal como el ácido nucleico genómico o cualquier ácido nucleico derivado del mismo tal como los correspondientes hnARN, cADN y mARN, respectivamente. Hasta ahora, la molécula objetivo de la clase anteriormente mencionada de compuestos es preferiblemente el mARN de la proteína quinasa N beta.

Las ribozimas son ácidos nucleicos catalíticamente activos que consisten preferiblemente de ARN que comprende básicamente dos porciones. La primera porción muestra una actividad catalítica mientras que la segunda porción es responsable de la interacción específica con el ácido nucleico objetivo, en el presente caso el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta. Luego de la interacción entre el ácido nucleico objetivo y la segunda porción de la ribozima, normalmente mediante hibridación y emparejamiento de bases Watson-Crick de esencialmente los tramos de bases complementarios sobre las dos cadenas de hibridación, la porción catalíticamente activa se puede volver activa lo que significa que esta cataliza intramolecular o intermolecularmente, el ácido nucleico objetivo en el caso de que la actividad catalítica de la ribozima sea la actividad de la fosfodiesterasa. Posteriormente, puede haber una degradación adicional del ácido nucleico objetivo que al final da como resultado la degradación del ácido nucleico objetivo así como también la proteína derivada de dicho ácido nucleico objetivo que en el presente caso es la proteína quinasa N beta debido a la falta de proteína quinasa N beta recientemente sintetizada y un recambio de proteína quinasa N beta existente anterior. Las ribozimas, su uso y principios de diseño son conocidos por el experto en la técnica, y, por ejemplo se describen en Doherty y Doudna (Ribozym structures and mechanism. Annu ref. Biophys. Biomolstruct. 2001; 30: 457-75) y Lewin y Hauswirth (Ribozyme Gene Therapy: Applications for molecular medicine. 2001 7:221-8).

El uso de oligonucleótidos antisentido para la fabricación de un medicamento y como un agente de diagnóstico, respectivamente, se basa en un modo similar de acción. Básicamente, los oligonucleótidos antisentido se hibridizan con base en complementariedad de la base, con un ARN objetivo, preferiblemente con un mARN, activan de esta manera la RNasa H. La RNasa H se activa mediante tanto el fosfodiéster como el ADN acoplado a fosforotioato. Sin embargo, el ADN acoplado a fosfodiéster se degrada rápidamente mediante las nucleasas celulares con la excepción del ADN acoplado a fosforotioato. Estos derivados de ADN de ocurrencia no natural resistentes no inhiben la RNasa H luego de la hibridación con el ARN. En otras palabras, los polinucleótidos antisentido son solamente efectivos como complejos de híbridos de ADN ARN. Ejemplos de esta clase de oligonucleótidos antisentido se describen, entre otros, en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,849,902 y 5,989,912. En otras palabras, con base en la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula objetivo que en el presente caso es el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, o de la proteína de objetivo de la cual se puede deducir una secuencia de ácidos nucleicos respectiva en principio, o al conocer la secuencia de ácidos nucleicos como tal, particularmente el mARN, se pueden diseñar los oligonucleótidos antisentido adecuados con base en los principios de complementariedad de base.

Particularmente preferidos son los oligonucleótidos antisentido que tienen un tramo corto de ADN fosforotioato (3 a 9 bases). Se requiere un mínimo de 3 bases de ADN para la activación de la RNasa H bacteriana y se requiere un mínimo de 5 bases para la activación de la RNasa H de mamífero. En estos oligonucleótidos quiméricos existe una región central que forma un sustrato para la RNasa H que está flanqueada por los "brazos" hibridantes comprendidos de nucleótidos modificados que no forman sustratos para la RNasa H. Se pueden modificar los brazos hibridantes de los oligonucleótidos quiméricos tal como mediante 2'-O-metilo o 2'-fluoro. Los métodos alternativos utilizan enlaces de

metilfosfonato o fosforamidato en dichos brazos. Las realizaciones adicionales del oligonucleótido antisentido útil en la práctica de la presente invención son los P-metoxioligonucleótidos, P-metoxioligodesoxirribonucleótidos parciales o P-metoxioligonucleótidos.

5 De particular relevancia y utilidad para la presente invención son aquellos oligonucleótidos antisentido como se describe particularmente en las dos patentes Estadounidenses mencionadas anteriormente. Estos oligonucleótidos contienen nucleótidos ligados 5'→3' de ocurrencia no natural. En cambio, los oligonucleótidos tienen dos tipos de nucleótidos: 2'-desoxifosforotioato, que activa la RNasa H, y nucleótidos 2'-modificados que no la activan. Los enlaces entre los nucleótidos 2'-modificados pueden ser fosfodiésteres, fosforotioato o P-etoxifosfodiéster. La activación de la RNasa H se logra por una región de activación de RNasa H contigua, que contiene entre 3 y 5 nucleótidos 2'-desoxifosforotioato para activar la RNasa H bacteriana y entre 5 y 10 nucleótidos 2'-desoxifosforotioato para activar la RNasa H eucariótica y, particularmente, mamífera. La protección de la degradación se realiza al elaborar la nucleasa de bases terminales 5' y 3' altamente resistentes y, opcionalmente, al colocar un grupo de bloqueo de terminal 3'.

15 Más particularmente, el oligonucleótido antisentido comprende un terminal 5' y un terminal 3'; y desde 11 hasta 59 nucleótidos enlazados 5'→3' seleccionados independientemente del grupo que consiste de nucleótidos de fosfodiéster 2'-modificados y nucleótidos de P-alkiloxifosfotriéster 2'-modificado; y en donde el nucleósido de terminal 5' se adhiere a una región de activación de RNasa H de entre tres y diez desoxirribonucleótidos ligados a fosforotioato contiguos, y en donde el terminal 3' de dicho oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en un desoxirribonucleótido invertido, un tramo contiguo de uno a tres ribonucleótidos 2'-modificados de fosforotioato, un grupo biotina y un nucleótido de P-alkiloxifosfotriéster.

20 También se puede utilizar un oligonucleótido antisentido en donde el nucleósido de terminal 5' no se adhiere a la región de activación de RNasa H sino a nucleósido de terminal 3' como se especificó anteriormente. También, el terminal 5' se selecciona del grupo particular en lugar del terminal 3' de dicho oligonucleótido.

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

Se pueden caracterizar dos clases de oligonucleótidos antisentido particularmente preferidos como sigue:

30 La primera clase de oligonucleótidos antisentido, también denominada aquí como la segunda generación de oligonucleótidos antisentido, comprende un total de 23 nucleótidos que comprenden en la dirección 5'→3' un tramo de siete 2'-O- metilribonucleótidos, un tramo de nueve 2'-desoxirribonucleótidos, un tramo de seis 2'-O-metilribonucleótidos y un 2'-desoxirribonucleótido de terminal 3'. Del primer grupo de siete 2'-O-metilribonucleótidos los primeros cuatro se ligan con fosforotioato, mientras que los posteriores cuatro 2'-O-metilribonucleótidos se ligan con fosfodiéster. También, existe un enlace de fosfodiéster entre el último, es decir, el extremo más terminal 3' de los 2'-O-metilribonucleótidos y el primer nucleótido del tramo que consiste de nueve 2'- desoxirribonucleótidos. Todos los 2'-desoxirribonucleótidos se ligan con fosforotioato. También está presente un enlace de fosforotioato entre el último, es decir, el 2'-desoxinucleótido más terminal 3' y el primer 2'-O-metilribonucleótido del tramo posterior que consiste de seis 2'-O-metilribonucleótidos. De este grupo de seis 2'- O-metilribonucleótidos los primeros cuatro de ellos, nuevamente en la dirección 5'→3', se ligan con fosfodiéster, mientras que los últimos tres, que corresponden a las posiciones 20 a 22 se ligan con fosforotioato. El último, es decir, el 2'-desoxinucleótido de terminal 3' se liga al último, es decir, al 2'-O-metilribonucleótido más terminal 3' a través de un enlace de fosforotioato.

45 También se puede describir la primera clase mediante referencia a la siguiente estructura esquemática: RRRnnnnNNNNNNNNnnRRRN. Por esto, R indica ribonucleótidos 2'-O-metilo ligados a fosforotioato (A, G, U, C); n significa ribonucleótidos de 2'-O-metilo (A, G, U, C); N representa desoxirribonucleótidos ligados a fosforotioato (A, G, T, C).

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

50 En el extremo del terminal 5' se encuentra un nucleótido abásico invertido que es una estructura adecuada para conferir resistencia contra la actividad de exonucleasa y, se describe, por ejemplo en el documento WO 99/54459. Este abásico invertido se liga a un tramo de cinco a siete 2'-O-metilribonucleótidos que se ligan a fosfodiéster. Después de este tramo de cinco a siete 2'-O- metilribonucleótidos se encuentra un tramo de siete a nueve 2'-O- desoxirribonucleótidos todos los cuales se ligan a fosforotioato. El enlace entre el último, es decir, el 2'-O-metilribonucleótido más terminal 3' y el primer 2'-O-desoxinucleótido del 2'-desoxinucleótido que comprende el tramo ocurre a través de un enlace de fosfodiéster. Adyacente al tramo de siete a nueve 2'-desoxinucleótidos se conecta un tramo consistente de cinco a siete 2'-O-

metilribonucleótidos. El último 2'-O-desoxinucleótido se liga al primer 2'-O-metilribonucleótido del último tramo mencionado que consiste de cinco a siete 2'-O- metilribonucleótidos ocurre mediante un enlace de fosforotioato. El tramo de cinco a siete 2'-O-metilribonucleótidos se ligan a fosfodiéster. En el extremo terminal 3' del segundo tramo de cinco a siete 2'-O-metilribonucleótidos se adhiere otro abásico invertido.

- 5 También se puede describir esta segunda clase mediante referencia a la siguiente estructura esquemática: (GeneBiocs que representa la 3a generación de oligonucleótidos antisentido también tiene la siguiente estructura esquemática): cap-(n_p)_x(N_s)_y(n_p)_z-cap o cap-nnnnnnnnnNNNNNNNNNNnnnnnnn-cap. Por esto, cap representa abásicos de desoxi invertidos o modificaciones similares en ambos extremos; n significa ribonucleótidos de 2'-O-metilo (A, G, U, C); N representa desoxirribonucleótidos ligados a fosforotioato (A, G, T, C); x representa un entero de 5 a 7; y representa un entero desde 7 hasta 9; y z representa un entero desde 5 hasta 7.

Se debe observar que los enteros x, y y z se pueden seleccionar independientemente uno del otro aunque se prefiere que x y z sean iguales en un oligonucleótido antisentido dado. De acuerdo con lo anterior, las siguientes estructuras o diseños básicos de los oligonucleótidos antisentido de tercera generación pueden ser como sigue: cap-(n_p)₅(N_s)₇(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₇(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₇(N_s)₇(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₅(N_s)₈(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₈(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₇(N_s)₈(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₅(N_s)₉(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₉(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₇(N_s)₉(n_p)₅-cap, cap-(n_p)₅(N_s)₇(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₇(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₇(N_s)₇(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₅(N_s)₈(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₈(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₇(N_s)₈(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₅(N_s)₉(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₉(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₇(N_s)₉(n_p)₆-cap, cap-(n_p)₅(N_s)₇(n_p)₇-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₇(n_p)₇-cap, cap-(n_p)₇(N_s)₇(n_p)₇-cap, cap-(n_p)₅(N_s)₈(n_p)₇-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₈(n_p)₇-cap, cap-(n_p)₇(N_s)₈(n_p)₇-cap, cap-(n_p)₅(N_s)₉(n_p)₇-cap, cap-(n_p)₆(N_s)₉(n_p)₇-cap y cap-(n_p)₇(N_s)₉(n_p)₇-cap.

- 20 Una clase adicional de compuestos que se puede generar con base en las enseñanzas técnicas dadas aquí y que se puede utilizar como medicamentos y/o agentes de diagnóstico es el ARN de interferencia pequeña (siARN) dirigido al ácido nucleico, preferiblemente mARN, que codifica la proteína quinasa N beta. El siARN es un ARN de doble cadena que tiene normalmente una longitud de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. La secuencia de una de las dos cadenas de ARN corresponde a la secuencia del ácido nucleico objetivo tal como el ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, que se va a degradar. En otras palabras, conociendo la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula objetivo, en el presente caso la proteína quinasa N beta, preferiblemente la secuencia de mARN, un ARN de doble cadena se puede diseñar con una de las dos cadenas que es complementaria, por ejemplo, a dicho mARN de proteína quinasa N beta y, después de aplicación de dicho siARN a un sistema que contiene el gen, ADN genómico, hnARN, o mARN que codifica la proteína quinasa N beta, el ácido nucleico objetivo respectivo se degradará y de esta manera se reducirá el nivel de proteína respectiva. Los principios básicos para diseñar, construir, y utilizar dicho siARN como medicamento y agente de diagnóstico, respectivamente, entre otros, se describe en las solicitudes de patente internacional WO 00/44895 y WO 01/75164.

Con base en los principios de diseño mencionados anteriormente, es posible generar dicho siARN, oligonucleótidos antisentido y ribozima, respectivamente, una vez que se conoce la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína quinasa N beta. También es cierto para las moléculas precursoras de ácidos nucleicos tales como hnARN, cADN y similares, que incluyen ácido nucleico genómico. Por supuesto, conociendo también la cadena antisentido respectiva se puede permitir el diseño de dichos compuestos con base en ácido nucleico dado el principio básico de complementariedad de par base, preferiblemente con base en el emparejamiento base de Watson-Crick. De acuerdo con lo anterior, un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con siARNs específicos, ribozimas y nucleótidos antisentido los cuales se dirigen contra o son específicos a proteína quinasa N-beta. En lo siguiente, esto se ilustra adicionalmente mediante el siARN, sin embargo, esto también aplica a oligonucleótidos antisentido y ribozimas, como lo reconocerán los expertos en la técnica.

Dicho siARN preferiblemente comprende una longitud desde 15 hasta 5 nucleótidos, por lo cual esto significa realmente cualquier longitud que comprende 15, 16,17, 18, 20,21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. En realizaciones adicionales, el siARN puede exhibir incluso más nucleótidos. De acuerdo con los principios de diseño conocidos en la técnica, se puede generar el siARN respectivo. De acuerdo con lo anterior, el siARN reivindicado aquí comprende un tramo de preferiblemente cualquier longitud de nucleótido desde 15 hasta 25 nucleótidos consecutivos que ya sea por lo menos parcialmente complementario a la cadena sentido o antisentido que codifica la PKN-beta, y una segunda cadena de ribonucleótidos la cual es por lo menos parcialmente complementaria a la primera y de esta manera a la cadena antisentido y cadena sentido respectivamente, que codifica la proteína quinasa N-beta. Se puede aplicar cualquier principio de diseño conocido en la técnica de generación o fabricación de siARN a esta clase de estructura doble. El espacio de siARN descrito aquí comprende moléculas de siARN cuya cadena antisentido inicia con un nucleótido que corresponde al nucleótido No. 1 de una secuencia que codifica la PKN-beta como se especificó anteriormente. Adicionalmente dichas moléculas de siARN comienzan con un nucleótido que corresponde al nucleótido no. 2 de una secuencia que codifica la PKN-beta como se especificó anteriormente, y así sucesivamente. Esta clase de escaneo sobre la secuencia que codifica la PKN-beta se repite con el fin de suministrar todas las moléculas de siARN posibles las cuales se pueden dirigir contra PKN-beta. La longitud de cualquiera de las moléculas de siARN generadas de esta manera puede ser cualquier longitud adecuada para el siARN, particularmente cualquier longitud como se especificó anteriormente. Preferiblemente, las diversas moléculas de siARN del espacio de molécula de siARN descrito aquí, se sobreponen excepto el nucleótido más terminal 5' de la cadena antisentido o cadena sentido. Es obvio que las

secuencias antisentido obtenidas de esta manera tienen que complementarse mediante el emparejamiento base con el fin de formar por lo menos parcialmente la estructura de doble cadena requerida para un siARN funcionalmente activo.

5 Con base en el modo de acción de las clases de compuestos mencionadas anteriormente, tales como anticuerpos, péptidos, anticalinos, aptámeros, espiegélmeros, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, así como también siARN, de esta manera está dentro de la presente invención utilizar cualquiera de estos compuestos que se dirigen a la proteína quinasa N beta y el ácido nucleico que codifica la misma, respectivamente, para la fabricación de un medicamento o un agente de diagnóstico para cualquiera de las enfermedades que se describen aquí y cualquiera de las condiciones de enfermedad descritas aquí. Adicionalmente, se pueden utilizar estos agentes para monitorear el progreso de dichas enfermedades y condiciones de enfermedad y el éxito de cualquier terapia aplicada, respectivamente.

10 Las diversas clases de compuestos diseñados de acuerdo con la presente invención tales como anticuerpos, péptidos, anticalinos, moléculas pequeñas, aptámeros, espiegélmeros, ribozimas, oligonucleótidos antisentido y siARN también pueden estar contenidos en una composición farmacéutica. Preferiblemente dicha composición farmacéutica se utiliza para el tratamiento de las enfermedades como se describe aquí o las condiciones de enfermedad descritas aquí. En una realización la composición farmacéutica puede comprender una o varias de las clases de compuestos mencionadas
15 anteriormente y/o uno o más miembros de una sola clase, y opcionalmente un compuesto farmacéutico activo adicional, y un portador farmacéuticamente aceptable. Dicho portador puede ser o líquido o sólido, por ejemplo, una solución, un regulador, una solución alcohólica o similares. Los portadores sólidos adecuados, entre otros, son almidón y similares. El experto en la técnica sabe suministrar formulaciones respectivas para los diversos compuestos de acuerdo con las clases de compuestos anteriormente mencionadas con el fin de realzar la ruta particular de administraciones tales como
20 oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular y similares.

Los diversos compuestos de las diferentes clases de compuestos como se mencionó anteriormente, pueden estar también, solos o en combinación, sujetos a o contenidos en un equipo. Dicho equipo comprende aparte de(los) compuesto(s) respectivo(s) adicionalmente uno o varios elementos o compuestos adicionales por lo cual los elementos se seleccionan del grupo que comprende reguladores, controles negativos, controles positivos e instrucciones sobre el
25 uso de los diversos compuestos. Preferiblemente, los diversos compuestos están presentes ya sea en forma seca o líquida, preferiblemente como una dosificación unitaria para la administración individual de cada uno. El equipo se puede utilizar particularmente para terapia, diagnóstico o monitorización del progreso de la enfermedad o terapias aplicadas con relación con las enfermedades y condiciones de enfermedad como se describe aquí.

30 La presente invención se ilustra ahora adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos que no pretenden limitar el alcance de la protección. A partir de dichas figuras y ejemplos se pueden tomar características, realizaciones y ventajas adicionales, en donde

La Figura 1 muestra una representación esquemática del factor de crecimiento inducido por la activación de la ruta de PI 3-quinasa;

35 La Figura 2 muestra la medición de metástasis del ganglio linfático en un modelo de ratón PC-3 ortotópico después de tratamiento con rapamicina;

La Figura 3 muestra el método experimental para identificar PKNbeta como un objetivo de fármaco en dirección 3' de la ruta de PI 3-Quinasa;

La Figura 4 muestra una pantalla de GeneBloc primaria sobre PKN beta;

La Figura 5 muestra el crecimiento de células PC3 transfectadas con GB específico de PKNbeta sobre matrigel;

40 La Figura 6 muestra la interferencia de ARN mediante expresión transitoria de siARN en las células HeLaB;

La Figura 7 muestra fotografías de células de próstata humana y células de cáncer de próstata humano luego de hibridación utilizando secuencias antisentido y sentido de proteína quinasa N beta como sondas;

45 La Figura 8 muestra un diagrama que representa el volumen de los tumores primarios en un modelo de tumor de próstata ortotópico que utiliza dos diferentes construcciones de siARN (Figura 8A); un diagrama que representa el volumen de metástasis de ganglio linfático en un modelo de tumor de próstata ortotópico que utiliza dos construcciones diferentes de siARN (Figura 8B), y fotografías de próstata y ganglios linfáticos en un modelo de tumor de próstata ortotópico que utiliza siARN de control (Figura 8C1) y una construcción de siARN específica a la proteína quinasa N beta (Figura 8C2);

50 La Figura 9 muestra un análisis de transferencia de Western de diferentes derivados de proteína quinasa N beta y sus actividades utilizando MPB como un sustrato de fosforilación estándar después de sobreexpresión transitoria en células HeLa y anticuerpo de anti-proteína quinasa N beta (anti-PK) para detectar los niveles de expresión relativos de los

derivados de quinasa (Figura 9A), un análisis de transferencia de Western adicional de diferentes derivados de proteína quinasa N beta utilizando un anticuerpo específico para la forma fosforilada de la proteína quinasa N beta (Figura 9B), y una representación esquemática de los diversos derivados de proteína quinasa N beta utilizados (Figura 9C);

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

10 La Figura 11 muestra los resultados de ensayos de inmunoprecipitación para detectar la fosforilación de los sustratos de proteína quinasa N beta para detectar la forma fosforilada de la misma mediante análisis de transferencia de Western (Figura 11A) o la incorporación de fosfato marcado ³²P mediante autoradiografía (Figura 11B). Con el fin de asegurar que estuvieran presentes cantidades comparables de PKNbeta en los precipitados inmunes respectivos, se volvió a sondear el filtro mostrado en la Figura 11A utilizando un anticuerpo de anti-PKNbeta ("quinasa", Figura 11C).

La Figura 12 muestra un análisis de transferencia de Western que compara la expresión de la proteína quinasa N beta endógena en muestras que fueron tratadas con LY294002 durante diferentes momentos en células HeLa y PC-3. Fue monitorizado el nivel de AKT fosforilado en paralelo para confirmar la eficacia del inhibidor de PI 3-quinasa.

15 La Figura 13 muestra las cantidades de proteína relativa y las actividades de quinasa de diversos derivados de PKNbeta recombinante presentes en inmunocomplejos. Las células que expresan las proteínas recombinantes respectivas se habían tratado con el inhibidor LY294002 de PI 3-quinasa antes de la lisis durante los momentos indicados.

20 La Figura 14 muestra un panel de imágenes, por lo cual se investigó la distribución celular de PKN beta y derivados de la misma tales como PKN beta de tipo silvestre (Figura 14A), derivado TA de PKN beta (Figura 14B), derivado KE de PKN beta (Figura 14C) y PKN beta deltaN (Figura 14D) por microscopía de fluorescencia confocal. Los derivados recombinantes etiquetados con HA de PKNbeta se expresaron transitoriamente en células HeLa durante 48 horas. Después de fijación y permeabilización, se detectó la expresión de proteínas recombinantes al utilizar un anticuerpo anti- HA seguido por un anticuerpo de anti-ratón conjugado con FITC. Las células se contratiñeron al marcar la actina citoesquelética con rodamina-paloidina.

25 La Figura 1 muestra una representación esquemática del factor de crecimiento que induce la activación de la ruta de PI 3-quinasa. La estimulación del factor de crecimiento de las células lleva a una activación de sus receptores afines en la membrana celular, que a su vez se asocian y activan moléculas de señalización intracelular tales como PI 3-quinasa. El PTEN supresor de tumores interfiere con las respuestas en dirección 3' mediadas por PI 3-quinasa y asegura que la activación de la ruta ocurre de manera transitoria. El LY294002 es un inhibidor de moléculas pequeñas de la PI 3-quinasa. Uno de los genes en dirección 3' conocidos de PI 3-K es mTOR (objetivo de mamífero de Rapamicina) que se puede inhibir por el fármaco rapamicina (Rapamune) aprobado clínicamente. La PI 3-K está involucrada en la regulación de la proliferación celular, supervivencia celular, transporte de glucosa, traducción, metástasis y migración. X son los efectores en dirección 3' de indicación que representan los objetivos de fármaco potenciales que se pronostican por estar involucrados en promover el comportamiento metastásico de células de cáncer. Esta clase de moléculas efectoras que actúan adicionalmente en dirección 3' en la ruta es probable que representen mejores objetivos de fármaco que los objetivos más "en dirección 5'" tales como mTOR, dado que tienen pocos efectos pleiotrópicos.

La materia objeto de la Figura 2 a la Figura 5 se describe en más detalle en relación con los siguientes ejemplos.

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

40 (A) Las moléculas de siARN se generaron por la expresión accionada por el promotor (U6+2) de secuencias específicas objetivo (plantilla derivada del gen de interés que contiene secuencias complementarias sentido e inversa de 21-mero ligadas por el tramo poli A 12-mero. Luego es probable que los ARN de transcripción formen moléculas de siARN de doble cadena.

(B) Secuencias de plantilla de genes dirigidos para expresión de siARN. Las secuencias correspondientes se introdujeron en vectores de expresión que llevan el casete del promotor U6+2.

45 (C) Efecto de la expresión de siARN sobre el crecimiento y proliferación celular. Las construcciones (véase anteriormente) se expresaron transitoriamente mediante transfección en células HeLaB para experimentos de interferencia de ARNi. Las células se cosecharon 48 horas después de ser transfectadas y se sembraron posteriormente (80000 células por pozo) en gel "matrigel". El efecto de la interferencia de ARN en la expresión de los genes correspondientes se analizó al ensayar las células transfectadas para crecimiento/proliferación en matrigel. La expresión de siARN dirigida a a PTEN no tuvo efecto sobre el crecimiento de células HeLaB sobre el matrigel (panel derecho), mientras que la expresión de siARN específica a p110beta y PKNbeta alteraron severamente el comportamiento del crecimiento de HeLaB en matrigel (paneles intermedio y derecho).

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Cultivo celular

Se obtuvieron células PC-3 de carcinoma de próstata humano de la Colección Americana de Cultivos de Tipo (ATCC). Las células se cultivaron en una Mezcla Nutriente F12K (modificación de Kaighn) que contenía 10% de suero bovino fetal (CS), gentamicina (50 µg/ml) y anfotericina (50 ng/ml). Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos o de 10 cm (a una confluencia de 30% a 50%) al utilizar diversos lípidos catiónicos tales como Oligofectamina, Lipofectamina (Life Technologies), Argfectin50 o Profectin50 (Atugen/GOT Berlín, Alemania), o FuGene 6 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los GeneBlocs se transfectaron al agregar un complejo concentrado 5x formado previamente de GeneBloc y Lípido en un medio libre de suero a células en medio completo. El volumen de transfección total fue de 100 µl para las células colocadas en placas de 96 pozos y 10 ml para células en placas de 10 cm. La concentración final de lípidos fue de 0.8 a 1.2 µg/ml dependiendo de la densidad celular; la concentración de GeneBloc se indica en cada experimento.

Las células cultivadas se sometieron a tripsina y cosecharon después de detener el efecto de tripsina por el medio. Se agregan procedimientos de enjuague (PBS; Centrifugación 5 min/1.000 rpm) y, finalmente, el sedimento se vuelve a suspender considerando el número y volumen celular que se va a inocular.

Determinación de las cantidades relativas de niveles de ARN mediante análisis Taqman.

El ARN de las células transfectadas en 96 pozos se aisló y purificó utilizando el equipo Invisorb RNA HTS 96 (InVitec GMBH, Berlín). La inhibición de la expresión de mRNA de PKN beta se detectó mediante análisis de RT-PCR (Taqman) en tiempo real utilizando cebador 5' de PKNbeta 300 nM, cebador 3' de PKNbeta 300 nM y 100 nM de sonda Taqman PKNbeta etiquetada con Fam-Tamra. La reacción se llevó a cabo en 50 µl y se ensayó en el detector de Secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante bajo las siguientes condiciones: 48° C durante 30 minutos, 95° C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 60° C.

Crecimiento in vitro sobre matriz de matrigel.

Las células de PC3 se trataron con 5 µM de LY294002 o DMSO cuando se sembraron sobre Matrigel. Si las células se transfectaron antes de sembrarlas, estas se transfectaron con GeneBloc y se sometieron a tripsina 48 horas después de transfección. Las células se enjuagaron en medio y se sembraron en 24 pozos duplicados (100.000 células por pozo) se cubrieron previamente 250 µl de matriz de membrana base de matrigel (Becton Dickinson). Después de incubación durante 24 a 72 horas se tomaron fotografías a una magnificación de 5x con una cámara AxioCam adherida a un microscopio Axiovert S1 00(Zeiss).

Affymetrix

Se preparó ARN total desde el crecimiento de células sobre Matrigel utilizando el equipo Totally ARN (AMBION) siguiendo el protocolo de los fabricantes. En la etapa final se volvió a suspender el ARN total precipitado en el regulador de lisis Invisorb y se purificó utilizando el equipo spin cell-RNA Invisorb (INVITEK). Se preparo el cARN marcado con biotina siguiendo los protocolos de Affymetrix y se hibridizaron 15 µg de cARN sobre el juego HG-U95 de Affymetrix Genechip.

Análisis de datos

Se analizaron los datos en bruto utilizando el software Microarray Suite v4.0 de Affymetrix Genechip. La intensidad de cada juego de sonda se calcula como la diferencia de la señal de hibridación de oligonucleótidos de emparejamiento perfecto en comparación con los oligonucleótidos mal emparejados promediados sobre el equipo de 16 a 20 pares de sondas que corresponden a una transcripción. La diferencia promedio de un juego de sondas es proporcional a la abundancia de una transcripción. Las intensidades totales de señal de diferentes arreglos se escalaron al mismo valor antes de comparación. Los cambios de veces se calcularon utilizando el software Affymetrix mediante comparación en forma de pares de las intensidades de los pares de sonda correspondientes a partir del experimento y los arreglos iniciales. Utilizando las matrices de decisión descritas por Affymetrix el software también genera lecturas absolutas (la transcripción esta ausente, marginal o presente en un experimento) y lecturas de diferencia (abundancia de una transcripción en un experimento en comparación con otro: incremento, incremento marginal, sin cambios, disminución marginal, disminución). Los resultados se exportaron a Microsoft Excel (lectura absoluta, lectura de diferencia, cambio de veces) y se filtraron. Se descartaron todos los conjuntos de sonda con lecturas ausentes o una lectura sin cambio y se clasificaron en la tabla por el cambio de veces.

Estudios en animales

Se realizaron los experimentos in vivo correspondientes a las Buenas Prácticas de Laboratorio para Estudios No Clínicos de Laboratorio (GLP Regulations) de la Administración de Fármacos y Alimentos y de acuerdo con la ley Alemana de protección a animales como base legal.

5 Ratones Shoe:NMRI-nu/nu machos (Tierzucht Schönwalde GmbH) conservados bajo condiciones de SPF (equipo de flujo de aire laminar, Scantainer, Scanbur) servidos como receptores para células de carcinoma de próstata humana. Los animales, con edades de 6-8 semanas y con pesos de 28-30 g, se inocularon con $2 \times 10^6 / 0,03$ ml de células de tumor en el lóbulo dorsolateral izquierdo de la glándula prostática (iprost; Orthotopic) o la punta del lóbulo lateral izquierdo del hígado (ihcp; Ectopic). Para este propósito, los ratones recibieron una anestesia corporal general utilizando una mezcla de Ketanest (Parke-Davis GmbH) y Rompun (Bayer Vital GmbH) 80:1 con dosificaciones de 100 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente. Siguiendo esterilización profunda de la superficie corporal ventral se llevó a cabo una incisión a través de la piel abdominal y la pared peritoneal comenzando cerca del borde de la glándula prepucial y que mide aproximadamente 1 cm. Por medio de un par de tenazas y un estropajo de algodón se visualizó la glándula prostática. La célula ortotópica se inoculó seguida con la ayuda de una lupa y mediante el uso de una jeringa de 1 ml (Henke Sass Wolf GmbH) que tiene agujas microlanza 30G 0.30x13 (Becton Dickinson). Fue exitosa una administración que observa una ampolla marcada en el sitio de inoculación. La herida se cerró mediante material de sutura (PGA Resorba, Franz Hiltner GmbH) que se refiere a la pared peritoneal y con abrazaderas Michel de 11x2 mm (Heiland) para la piel abdominal. Un atomizador de heridas (Hansaplast Sprühpflaster, Beiersdorf AG) cubrió la lesión. Durante la fase posquirúrgica los animales fueron mantenidos en un ambiente calentado hasta que se despertaron completamente. Los animales fueron seleccionados aleatoriamente de acuerdo con el número de grupos de tratamiento que consisten de 5-20 animales por cada grupo. Fueron inspeccionados exitosamente inclusive al protocolizar los hallazgos. Se lleva autoclave Ssniff NM-Z, 10 mm (ssniff Spezialdiäten GmbH) como dieta fortificada y se acidificó el agua potable con HCl, ambas ad libitum.

Evaluaciones

25 Para recibir el nivel de dosificación real se registraron los pesos corporales los días de tratamiento. Al mismo tiempo, se puede derivar del desarrollo de peso corporal con el fin de reconocer las influencias de realizaciones de tratamiento en todo el organismo.

30 Se realizaron punciones en sangre en el día 0 (valor inicial); 14; 28; y 35 (sacrificio). Se extrajo la sangre de la vena orbital del animal anestesiado a corto plazo (Dietileter, Otto Fischer GmbH). Los parámetros de evaluación que proporcionan datos a la compatibilidad y efectos secundarios de los tratamientos son los siguientes: números de leucocitos; números de trombocitos; enzimas. Los parámetros adicionales transmitidos por la sangre fueron bilirrubina; creatinina; proteína; urea; ácido úrico.

35 Todos los animales sacrificados se disectaron completamente y se documentaron fotográficamente. Se midieron los tumores (glándula prostática) y metástasis (metástasis de ganglio linfático caudal, lumbar, renal) en dos dimensiones por medio de un par de calibreadores. Se calculó el volumen de acuerdo con $V \text{ (mm}^3\text{)} = ab^2/2$ con $b < a$. En general, el número de células que realizaron terapia provocaron una toma de tumor al 100% que se relaciona con glándula prostática. Los pesos de algunos órganos (Hígado; Bazo; Riñón) fueron registrados con el fin de encontrar datos adicionales que se relacionen con el conocimiento de efectos secundarios.

40 Para análisis histológicos, las muestras de tejidos de tumor, es decir, tumores prostático y metástasis de ganglio linfático, se fijaron en formaldehído al 5% y parafina incorporada. Habitualmente, las secciones se tiñeron con HE, si era necesario se realizaron tinciones específicas (Azan, PAS).

Para detectar el origen humano de las células de tumor y metastásicas, se congelaron muestras de tejido adecuadas en nitrógeno líquido. Al utilizar análisis de PCR y Taqman con amplicón específico de huHPRT se pudo detectar 50 células humanas en 5 mg de tejido.

Los resultados terapéuticos se verificaron estadísticamente mediante la prueba u de Mann y Whitney.

45 Ejemplo 2: Prueba de concepto experimental sobre la adecuabilidad de objetivos de fármaco en dirección 3'.

50 Como se bosqueja en la parte introductoria de esta especificación que se incorpora aquí mediante referencia, los objetivos ligados en dirección 3' a una ruta de señalización son valiosos para el diseño o desarrollo de medicamentos y agentes de diagnóstico. Es obvio que, si el objetivo particular se liga a otras rutas diferentes o se debe a su posición dentro de la ruta de señalización se liga a un número de fenómenos biológicos tales como, por ejemplo, metástasis y migración, apoptosis de traducción de crecimiento, ciclo celular, reparación de ADN y similares como en el caso de la PI 3-quinasa, cualquier compuesto que aborde este objetivo es propenso a tener un cierto número de efectos secundarios que pueden ser perjudiciales al sistema e indeseables desde el punto de vista médico. De acuerdo con lo anterior, los objetivos que actúan adicionalmente en dirección 3' deben ser la primera elección para la intervención terapéutica.

Los presentes inventores han encontrado que bajo el control de la ruta de PI 3-quinasa están involucrados posibles objetivos de fármaco adicionales aparte del mTOR, los cuales son específicos para controlar los fenómenos de metástasis y migración y de esta manera tumorigénesis. En la industria farmacéutica se ha encontrado que la rapamicina vendida bajo el nombre comercial de Rapamune es adecuada para inhibir la metástasis y migración. Esto confirma la idoneidad de la estrategia para abordar objetivos de fármaco en dirección 3'.

Como se puede observar de la Figura 2, la rapamicina es adecuada para reducir el volumen de metástasis de ganglio linfático y es en la medida comparable en su efecto con el inhibidor LY294002 de PI 3-quinasa conocido. Como se representa en la Figura 2A, se utilizó el modelo de toma de tumor y el tratamiento con Rapamune inició el día 1. Ambas concentraciones utilizadas, es decir, 0.4 mg/kg/dosis - 2 mg/kg/dosis llevaron a una tremenda disminución del grado de metástasis de ganglio linfático, expresada como un volumen medido de metástasis (mm³) en comparación con el control negativo que era solución salina regulada con fosfato.

Para los análisis histológicos, se fijaron muestras de tejidos de tumor, es decir, tumor prostático y metástasis de ganglio linfático, en formaldehído al 5% y parafina incorporada. Rutinariamente, la secciones se tiñeron con HE, si era necesario se realizaron tinciones específicas (Azan, PAS).

Básicamente también se obtuvieron los mismos resultados en el caso del tratamiento con Rapamune de un modelo de tumor establecido con el tratamiento que inició el día 28.

Se midió la metástasis de ganglio linfático en un modelo de ratón PC-3 ortotópico después del tratamiento con rapamicina (Rapamune). En la Figura 2(A) se muestran los resultados del modelo de toma de tumor (A). Ratones Shoe:NMRI-nu/nu sin pelo (8 por grupo) se inyectaron con 2x10⁶ células de PC3 en 0.03 ml de intraprostático y se llevó a cabo el tratamiento utilizando Rapamune intraperitonealmente a diario durante 28 días en dosis de 2 mg/kg y 0.4 mg/kg de PBS sirvió como control.

Para el tratamiento de tumores (B) establecidos, se permitió que los ipros crecieran durante 28 días y el tratamiento se llevó a cabo oralmente utilizando Rapamune los días 29 a 50 después de implante. Las dosis fueron seleccionadas como se representa en A. Los animales se sacrificaron el día 29 y 51, respectivamente y se determinó la metástasis total de ganglio linfático.

Ejemplo 3: Identificación de PKN beta como objetivo de fármaco en dirección 3' dentro de la ruta de PI 3-quinasa

El método experimental básico se muestra en la Figura 3. Las células de PC3 que crecen sobre Matrigel se trataron con DMSO o con el inhibidor PI 3-K LY294002 K y se aisló el ARN total de cada muestra. Se realizó el perfil de expresión genética Affymetrix y se confirmó la expresión utilizando en ensayo Taqman RT-PCR en tiempo real. Se utilizó p110β como un estándar no diferencial. Las células PC3 son PTEN -/- lo que significa que el PTEN supresor de tumores realmente carece de estas células de tal manera que la ruta de PI 3-quinasa se activa permanentemente lo cual conduce a un aumento de la actividad o comportamiento metastásico de las células que se expresa por su patrón de crecimiento en el ensayo de matrigel. Las células con un potencial de crecimiento invasivo exhiben un crecimiento mejorado sobre la membrana base tal como una matriz de matrigel. (Petersen, O.W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A.R. y Bissell, M.J. (1992). La interacción con membranas base sirve para distinguir rápidamente el patrón de crecimiento y diferenciación de las células epiteliales de mama humanas normales y malignas. Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 9064-9068. (También: Sternberger et al., 2002 Antisense & Nucleic acid drug development 12:131-143).

En relación con esto se debe observar que las células de PC3 se hicieron crecer sobre matrigel y tomaron esto como un sistema modelo que está próximo al ambiente in vivo, se asume que el ARN aislado del mismo está más próximo a la situación o resultados in situ que cualquier preparación obtenida a partir de células que se hacen crecer en un ambiente diferente a matrigel tal como una placa de cultivo celular convencional.

Ejemplo 4: Filtración de oligonucleótidos antisentido óptimos dirigidos a la proteína quinasa N beta.

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

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

En relación con el GeneBloc como se utiliza aquí en los diversos ejemplos se debe observar que todos son oligonucleótidos antisentido de tercera generación como se especifica aquí lo que significa, que también es obvio a

partir de la Tabla 1, que las letras mayúsculas representan los desoxirribonucleótidos que estuvieron ligados a través de un fosforotioato en lugar de un enlace de fosforodíéster.

Tabla 1: Resumen de los diversos GeneBlocs utilizados, sus alias, emparejamientos erróneos relativos al ácido nucleico objetivo y sus características estructuradas y de secuencia.

GeneBloc No	Alias	MM	Secuencia
70669	PKNbeta:706L21	0	ggagguCCAGTTTCTgagagg
70670	PKNbeta:377L21	0	uguuucACCTTCAGCuccaca
24536	PKNbeta:2021L23	0	aggacaaCACAAAGCCAcgtagaa
24537	PKNbeta:2665L23	0	gctctgaCACAAAGTCgaagtcc
24538	PKNbeta:2322L23	0	gcagtcaAACACCTCTtctctg
70210	PKNbeta:1034L21	0	caacacGGTTGTCCAacctta
70211	PKNbeta:1784L21	0	tcagtgCTTTGATGGcgtagt
70671	PKNbeta:183L21	0	cuucucGCAGTACAGgcucuc
70676	PKNbeta:1034L21	4	caagacGCTTGTGCAcgttta
70677	PKNbeta:1784L21	4	tcagagCTTAGTTGGcggtgt

5

Los diversos GeneBlocs corresponden a las siguientes SEQ. ID. Nos:

70669: SEQ. ID. NO.3

70670 SEQ. ID No. 4

24536 SEQ. ID No. 5

10 24537 SEQ. ID No. 6

24538 SEQ. ID No. 7

70210 SEQ. ID No. 8

70211 SEQ. ID No. 9

70671 SEQ. ID. NO.10

15 70676 SEQ. ID. NO.11

70677: SEQ. ID. NO.12

Adicionalmente se debe observar que cualquiera de las “t” anteriores son realmente “u” dado el hecho de que los oligonucleótidos antisentido mencionados anteriormente son GeneBlocs, es decir, oligonucleótidos antisentido de tercera generación.

20 Ejemplo 5: Desactivación selectiva de proteína quinasa N beta

Con el fin de probar que la proteína quinasa N beta es un objetivo de fármaco en dirección 3' adecuado de la ruta de PI 3-quinasa, se utilizaron los dos GeneBlocs particularmente ventajosos que se obtienen del ejemplo 4 en un matrigel con base en el experimento de crecimiento. El experimento de crecimiento de matrigel se toma como un modelo subrogado que muestra la metástasis y comportamiento de migración de la célula respectiva. Un crecimiento más confluyente de las células se toma como indicación de que se incrementan sus metástasis y comportamiento de migración lo cual le permite a las células dispersarse sobre la estructura tridimensional suministrada por el matrigel.

Las células de PC3 se transfectaron y sembraron sobre matrigel como se describe y se monitorizó el crecimiento. Se aisló mRNA de un alícuota de células sembradas sobre matrigel y se analizó utilizando el ensayo Taqman (panel izquierdo). El mRNA específico de PKNbeta se estandarizó a niveles de mRNA de p110 α endógeno. Se utiliza un GeneBloc específico a PTEN como control negativo en las células de PC-3⁻PTEN- y se utilizó un GeneBloc específico de p110 α como control positivo para el crecimiento en la matriz extracelular. La inhibición de crecimiento específico se muestra al comparar el crecimiento de células tratadas con el GeneBloc 70210 o 7021 1 específico a PKN beta contra sus oligonucleótidos emparejados erróneamente correspondientes 70676 y 70677, respectivamente.

También se ilustran los resultados respectivos en la Figura 5. A partir de esto se puede tener en cuenta que el bloque genético 70211 y 70210 pueden ser compuestos adecuados para la fabricación de un medicamento o agente de diagnóstico para el tratamiento de enfermedades y condiciones de enfermedad como se describe aquí.

Ejemplo 6: Interferencia de ARN mediante expresión transitoria de siARN en células HeLaB

Este experimento es un ejemplo del diseño exitoso de siARN que permite que se aborde específicamente la proteína quinasa N beta de objetivo de fármaco en dirección 3'. Como se ilustra en la Figura 6(A) las moléculas de siARN se generaron por la expresión abordada por el promotor (U6+2) de secuencias específicas objetivo (plantilla derivada del gen de interés que contiene secuencias complementarias sentido e inversa de 21-mero ligadas por el tramo poli A 12-mero. Después de transcripción, los ARNs son propensos a formar moléculas de siARN de doble cadena.

Se utilizaron diversas construcciones tales como p110beta y PTEN como control positivo y negativo, respectivamente en la misma construcción vectorial que el siARN diseñado contra la secuencia de mRNA de PKNbeta. El diseño respectivo se muestra en la Figura 6(B) donde las secuencias de plantilla de los genes objetivo para la expresión de siARN se introdujeron en vectores de expresión que llevan el casete del promotor U6+2.

Las construcciones se expresaron transitoriamente por la transfección en células HeLaB para experimentos de interferencia de ARNi. Las células se cosecharon 48 horas después de ser transfectadas y posteriormente se sembraron (80000 células por pozo) sobre matrigel. El efecto de interferencia de ARN en la expresión de genes correspondientes se analizó al ensayar células transfectadas para crecimiento/proliferación sobre matrigel. La expresión de siARN dirigida a PTEN no tuvo efecto sobre el crecimiento de células HeLaB sobre matrigel (panel derecho), mientras que la expresión de siARN específica a p110beta y PKNbeta alteró severamente el comportamiento del crecimiento de HeLaB sobre matrigel (paneles intermedio y derecho).

En vista de esto, la secuencia de siARN particular prueba que es un medio efectivo para el tratamiento de la enfermedad y condiciones de enfermedad como se describe aquí.

Ejemplo 7: Detección de proteína quinasa N beta en tumores de próstata humana

Con el fin de proporcionar evidencia adicional de que la proteína quinasa N beta es un objetivo adecuado en el tratamiento de tumores de próstata, se sometió tejido de próstata humana respectivo a hibridación in situ.

Para la hibridación in situ se prepararon cadenas sentido y antisentido de las posiciones de nucleótidos 1672 a 2667 de la secuencia NM 013355 en el vector Topo pCR4, con lo cual se utilizó la polimerasa T7 y T3 para propósitos de amplificación. Se hicieron crecer en ratones células de tumor de próstata humana (PC-3). Después de disección, el tejido se congeló a -20° C en solución de isopentano, se cortó en rebanadas a -15° C y se almacenó a -80° C. Antes de la hibridación, las rebanadas se fijaron en paraformaldehído. Las muestras de tumor humano se fijaron en paraformaldehído y se incorporaron en parafina. Se trataron muestras de tumor con proteinasa K y se acetilaron. Las sondas de ácido nucleico se mercaron doblemente con ³⁵S-ATP y ³⁵S-UTP y se incubaron con tejidos a 58° C en un regulador de hibridación (NaCl 0.4 M, formamida al 50%, 1x Denhardt's, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, sulfato de dextrano al 10%, 10 μ g/ml de cada tARN y ADN de esperma de salmón, DTT 10 mM) que contiene formamida al 50%.

El resultado de la hibridación in situ se representa en la Figura 7. Utilizando la sonda antisentido de proteína quinasa N beta para la hibridación in situ de tumor de próstata, las glándulas se tiñen intensivamente (Figura 7A). En contraste con esto, el tejido de próstata saludable se tiñe menos y se proporciona para solo una señal de fondo, utilizando nuevamente la sonda antisentido (Figura 7C). En contraste a esto, el uso de la sonda sentido en relación con ambos tejidos, no proporcionó ninguna señal.

Ejemplo 8: Reducción in vivo de tumores primarios y metástasis de ganglio linfático mediante siARN.

Este ejemplo se relaciona con la validación génica objetivo in vivo utilizando un modelo de tumor de próstata ortotópico en el que se puede mostrar que al utilizar el siARN dirigido a proteína quinasa N beta se puede realizar una reducción del tumor primario y la metástasis del ganglio linfático. Los resultados se representan en las Figuras 8A a 8C.

5 En el diagrama de la Figura 8A, el volumen de tumores primarios, determinados como se describe en el ejemplo 1, en un modelo de tumor de próstata ortotópico se podría reducir significativamente utilizando cualquiera de las dos siguientes construcciones de siARN:

5'actgagcaagaggctttggag o

5'aaattccagtggttcattcca.

10 Como control negativo, se utilizó el siARN contra la subunidad de p110- α y como control positivo, el siARN contra la subunidad de p110- β . De esta manera, el control positivo aborda el regulador en dirección 5' de PTEN de proteína quinasa N beta.

15 Se utilizó un grupo adicional de dos moléculas de siARN independientes para degradar el mRNA que codifica la proteína quinasa N beta en metástasis de ganglio linfático. Las metástasis de ganglio linfático son tumores secundarios encontrados en los siguientes ganglios linfáticos: Ganglios linfáticos Caudales, Lumbares, Renales y mediastinales por los cuales los ganglios linfáticos caudales están más cerca la próstata y los ganglios linfáticos mediastinales están más distantes al tumor de implante. Como en el caso del tumor primario, las construcciones de siARN obviamente redujeron exitosamente el mRNA que codifica la proteína quinasa N beta y de esta manera reduce el volumen del tumor (Figura 8B). Los controles positivo y negativo fueron como se describe en relación con la reducción del tumor primario. En
20 ambos casos, es decir, tumor primario y metástasis de ganglio linfático, las células de tumor de próstata humana se diseñaron genéticamente para expresar las moléculas de siARN respectivas a partir de un promotor U6 III de polimerasa.

25 Aparte de estos resultados, un análisis fenotípico claro como se representa en la Figura 8C1 y la Figura 8C2 muestran que después de la activación de la transcripción de la construcción de siARN en las células de tumor de próstata humana, las metástasis de ganglio linfático podrían reducirse significativamente y el ganglio linfático hinchado representado en la Figura 8C1 no está presente en el tejido tratado con siARN como se representa en la Figura 8C2.

Ejemplo 9: Caracterización funcional de la proteína quinasa N beta

30 Este ejemplo se relaciona con la caracterización funcional de la proteína quinasa N beta y particularmente con el impacto de la derivación, es decir, el truncamiento o mutación de residuos de aminoácidos funcionales, de proteína quinasa N beta sobre su actividad de quinasa y sobre la regulación de su actividad de quinasa mediante fosforilación.

Se generaron los siguientes derivados de proteína quinasa N beta como también por lo menos parcialmente se representan en la Figura 9C con los residuos de aminoácidos referentes a la secuencia de tipo silvestre como se describe aquí:

a) dominio de quinasa que comprende los aminoácidos 535- 889;

35 b) Δ N que comprende los aminoácidos 288-889;

c) dominio de quinasa que tiene una mutación en la posición 588 de lisina a arginina;

d) dominio de quinasa que tiene una mutación en la posición 588 de lisina a ácido glutámico;

40 e) derivados del dominio de quinasa que tienen mutaciones en el sitio de fosforilación (consenso de bucle de activación de AGC) con el residuo de treonina en la posición 718 del aminoácido ya sea se cambie a alanina (TA718) o a un ácido aspártico o ácido glutámico (TD718 o Te7 18); y

f) molécula de PKNbeta de tipo silvestre de longitud completa (889 aminoácidos).

Los fragmentos respectivos se expresaron transitoriamente en células HeLa. Se determinó su expresión relativa mediante análisis de transferencia de Western de los extractos de células HeLa utilizando un anticuerpo anti-PKNbeta.

Se generó el antisuero de anti-PKNbeta policlonal después de sobreexpresar los aminoácidos de terminal C (609-889) de PKNbeta en E.coli. El fragmento de proteína respectivo se purificó con gel a partir de cuerpos de inclusión, se recuperó y concentró de acuerdo con procedimientos estándar.

5 La proteína quinasa N beta tiene homologías a las moléculas de quinasa de tipo AGC en su dominio catalítico en el terminal C. La familia de quinasas se caracteriza por un residuo de treonina conservada en el bucle de activación del dominio catalítico que necesita ser fosforilado para la actividad enzimática. Debido a la alta conservación de esta treonina y el contexto de aminoácidos circundantes en el bucle de activación, los anticuerpos anti-fosfo contra este sitio están disponibles de fuentes comerciales. Los anticuerpos respectivos son denominados como anti-P*-PRK en la Figura 9 y como anti-P*AGC quinasa en la Figura 10.

10 El MPB es la proteína básica de mielina que es un sustrato de fosforilación in vitro estándar.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Derivado de proteína quinasa N beta	Actividad
Wt de longitud completa	++*
Dominio de quinasa que comprende aminoácidos 535-889	+*
Δ N que comprende aminoácidos 288-289	-*
Dominio de quinasa que tiene una mutación en la posición 588 de lisina a arginina (KR 588)	-*
Dominio de quinasa que tiene una mutación en la posición 588 de lisina a ácido glutámico (KE 588)	-*
TA718	-*
TD718 o TE718	-*!

* + : activo

- : inactivo

15 !: no se observó ninguna "hiperactivación" como se pudiese esperar de mutaciones comparables en otras quinasas (Morgan y Debond, 1994)

Los resultados se representan en la Figura 9.

20 La Figura 9A muestra un análisis en gel de diferentes derivados de proteína quinasa N beta y sus actividades utilizando MPB como un sustrato de fosforilación convencional después de sobreexpresión transitoria en células HeLa. Como se puede tomar de la Figura 9A aparte de la proteína quinasa N beta de longitud completa solo el dominio de quinasa en su otra forma silvestre se encuentra activo en MPB de fosforilación.

Utilizando los mismos derivados de proteína quinasa N beta se puede observar que excepto el derivado que comprende el dominio de quinasa que tiene la mutación T/A en la posición 718, todos los otros derivados exhibidos también se fosforilaron independientemente de sus actividades intrínsecas adicionales.

25 Los datos indican que la presencia de un dominio de quinasa funcional y fosforilación en la posición 718 son pre-requisitos para la actividad de quinasa de PKNbeta. Sin embargo, como se puede concluir de la incapacidad de la versión de Δ N para actuar como una quinasa, no son suficientes. Los datos también indican que la PKNbeta no se autofosforila en el aminoácido 718, sino que en cambio, requiere fosforilación por otra molécula de quinasa, dado que la proteína mutante KR588 defectuosa de quinasa mantiene la fosforilación en la posición 718.

Ejemplo 10: Caracterización de PKNbeta de longitud completa

30 Con el fin de analizar las mutaciones de residuos de aminoácidos funcionales de la proteína quinasa N beta en el contexto de la molécula de longitud completa, se llevaron a cabo los siguientes experimentos como se muestra en las Figuras 10 y 11:

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

Ejemplo 11: Requisitos de fosforilación para la actividad de la proteína quinasa N beta de longitud completa y desarrollo de un ensayo no radioactivo de quinasa in vitro – idoneidad de la proteína quinasa N beta para ensayos de HTS.

Las moléculas derivadas de PKNbeta se inmunoprecipitaron a partir de los extractos celulares mostrados en la Figura 10 al utilizar anticuerpos anti-tag. Los precipitados inmunes se enjuagaron como se describe (Klippel et al., 1996) y se dividieron en dos mitades. Una mitad se incubó con 5 µg de MBP (UBI) como un sustrato de fosforilación, MgCl₂ 4 mM y gamma ³²P-ATP en una solución regulada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionalmente, se agregaron inhibidores de fosfatasa y los inhibidores contra quinastas que actúan no específicamente como en Klippel et al., 1998. Se detectó incorporación de fosfato radioactivo mediante autoradiografía después de separar los productos de reacción por SDS-PAGE al 16% (Figura 11 B).

La segunda mitad de los precipitados inmunes se incubó con 1 µg de proteína de fusión GST-GSK3 (Cell Signaling Technology) como un sustrato de fosforilación en presencia de 200 µM de rATP. La mezcla de reacción posteriormente se analizó por un gradiente de SDS-PAGE al 8-16% y análisis de transferencia de Western utilizando el anticuerpo GSK3alfa anti-fosfo (Cell Signaling Technology) (Figura 11A). Luego el filtro se peló y se volvió a probar con un antisuero de anti-PKNbeta para confirmar la presencia de cantidades comparables de proteínas de PKNbeta en los precipitados inmunes respectivos (Figura 11 C).

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

La falta de señal en el caso de la variante de mutación de TA en el aminoácido 718 de la proteína quinasa N beta es de otra forma la proteína quinasa N beta de tipo silvestre de longitud completa indica que este residuo de aminoácido de hecho en la posición de fosforilación detectada por el anticuerpo (Figura 10B). El hecho de que las variantes deficientes en quinasa (mutación KE o KR como se muestra en la Figura 10 y la Figura 9, respectivamente) se fosforilan en este sitio indica que la treonina 718 no es un sustrato para autofosforilación. En cambio, otra quinasa en las células debe ser responsable de la fosforilación de este sitio; por lo que la PDK1 es un candidato posible.

También, a partir de este experimento en combinación con el del ejemplo 9 se revela que la fosforilación de la proteína quinasa N beta en la posición 718 es un pre-requisito para la actividad de proteína quinasa N beta; todas las mutaciones probadas en este sitio evitaban la fosforilación y resultan en un molécula de quinasa inactiva. En la medida en que una proteína quinasa N beta particularmente preferida que se puede utilizar en relación con cualesquier aspectos de la invención como se describe aquí es una proteína quinasa N beta que se fosforila en la posición 718 o un derivado de la misma, que incluye el derivado que comprende el dominio de quinasa solo como se describe aquí. Los datos indican adicionalmente que la PKNbeta de longitud completa no se autofosforila en el aminoácido 718, sino que en cambio, requiere la fosforilación por otra molécula de quinasa, dado que la proteína mutante de KE588 defectuosa de quinasa retiene la fosforilación en la posición 718.

Como se puede observar de la Figura 11, ensayar la actividad de la proteína quinasa N beta se puede adaptar en un formato que permite la filtración de los inhibidores de proteína quinasa N beta en un sistema de alto rendimiento.

En una primera etapa, se determinó la idoneidad de un formato de filtración no radioactivo, por lo que los diversos derivados de proteína-quinasa N beta como ya se describió con relación con el ejemplo 10, se utilizaron para fosforilar un sustrato adecuado. Dicho sustrato puede, por ejemplo, ser MBP o un péptido de GSK3 que se inmoviliza normalmente sobre un portador adecuado tal como microesferas de agarosa o sefarosa o sobre superficies plásticas. En el presente caso y como se representa en la Figura 11A, el sustrato es un péptido derivado de GSK3 fusionado a paramiosina. La primera fila indica que todos los diversos ensayos que utilizan diferentes derivados de proteína quinasa N beta que realmente contienen dichos derivados. Solo la proteína de quinasa N beta tipo silvestre de longitud completa o el dominio de de quinasa como se definió en el ejemplo 9 fueron adecuados para fosforilar el sustrato. Se detectó el sustrato fosforilado en el presente caso por el anticuerpo alfa GSK anti-fosfo (mencionado anteriormente)

Para asegurarse de que el método no radioactivo como se representa en la Figura 11A es suficientemente sensible se llevó a cabo el método radioactivo en paralelo con la mitad de los precipitados inmunes utilizando MBP como un sustrato de fosforilación. La eficacia de la actividad de quinasa puede tomarse a partir de la cantidad del sustrato fosforilado generado como se indica por la autoradiografía después de la incorporación de [³²P]. Como se puede observar a partir de las Figuras 11A y 11B, la proteína quinasa N beta de tipo silvestre de longitud completa así como

también el dominio de quinasa muestran actividad, mientras que (Figura 11A) no se detectó actividad de fondo de las quinastas no específicas (Figura 11B) con las proteínas mutantes KE de longitud completa y TA de longitud completa, respectivamente.

5 Para resumir, el uso de la proteína quinasa N beta de tipo silvestre de longitud completa así como también el dominio de quinasa como se describe aquí, son objetivos adecuados o medios para el diseño de un procedimiento de filtración en formato HTS. Las etapas respectivas comprenderán de acuerdo con lo anterior

10 a) generar proteína quinasa N beta recombinante purificada mediante expresión en un sistema de expresión no bacteriano tal como el sistema de células de insecto (ejemplo para una quinasa diferente en Klippel e al., 1997) en vista del hecho de que la proteína necesita fosforilarse para exhibir la actividad de quinasa, no que no se puede realizar fácilmente por la expresión en sistemas bacterianos;

b) inmovilizar el sustrato derivado de GSK-3 o sustrato similar, e incubar el sustrato con proteína quinasa N beta purificada en presencia de rATP, MgCl₂ e inhibidores en una solución regulada;

15 c) detectar la fosforilación del sustrato por un medio de detección apropiado tal como un anticuerpo similar al anticuerpo anti-fosfo-GSK3 opcionalmente después de enjuagues seriales y opcionalmente después desarrollarse secuencialmente en sistemas de ensayo Delfia o Lance (Perkin Elmer), por lo que el sitio de fosforilación se limita por un anticuerpo marcado con Europio. La cantidad de Europio unido se cuantifica después por el análisis de fluorescencia de resolución temporal.

Ejemplo 12: Determinación del nivel de expresión de PKN-beta endógena

20 En este ejemplo se proporciona evidencia experimental de que la PKN-beta se expresa de manera dependiente a la PI 3-quinasa. La expresión dependiente de la PI 3-quinasa del ARN de PKNbeta mostrada en la Figura 3 se confirma aquí adicionalmente sobre el nivel de proteína.

25 Las células de PC-3 se cultivaron como se describe en el ejemplo 1 aquí. Dichas células de PC-3 son PTEN -/-. Las células HeLa se obtuvieron de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) y se hicieron crecer como se describe en Sternberger et al. (2002). Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 10 cm (a una confluencia de 30% a 50%) utilizando Fugene 6 (Roche, Nutley, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células cultivadas se sometieron a tripsina y se cosecharon luego de detener el efecto de la tripsina por el medio.

Ambos tipos de células, es decir, células PC-3 y células HeLa se trataron durante los momentos indicados con 10 μM de LY294002 o DMSO, por lo cual se utilizó DMSO como solvente para LY294002 y, debido a esto, como control negativo.

30 Los extractos resultantes se fraccionaron por SDS-PAGE y se analizaron posteriormente mediante análisis de transferencia de Western. Se detectaron los niveles de las proteínas indicadas tales como p110, las cuales sirvieron como control de carga, PKN-beta endógena y Akt fosforilada utilizando los anticuerpos respectivos. La Akt fosforilada (P*-Akt) sirve como control para la eficacia del tratamiento mediado por LY294002.

Los resultados se representan en la Figura 12.

35 En las células de PC-3, la inhibición de PI 3-quinasa provocó una reducción visible de la expresión de PKNbeta endógena después de 24 horas, los niveles de proteína se redujeron adicionalmente después de 48 horas de tratamiento. En las células HeLa, que expresan cantidades mayores de proteína PKNbeta, este efecto fue menos dramático, pero se pueden detectar cantidades reducidas después de tratamiento de 48 horas con LY 294002.

A partir de esto se puede concluir que la PI 3-quinasa controla la expresión de PKN-beta.

Ejemplo 13: La actividad de PKN-beta requiere PI3-quinasa

40 La PKN-beta de tipo silvestre recombinante o los derivados de PKN-beta (como se describe en las Figuras 10-11) se expresaron transitoriamente en las células HeLa. Dichos derivados fueron TA derivado y KE derivado de PKN-beta como se describe en el ejemplo 10 aquí. La PKN-beta se modificó en cada caso mediante myc-tag como se describe anteriormente lo cual permitió la precipitación de PKN-beta y sus derivados utilizando un anticuerpo anti-Myc.

45 Para la evaluación de la actividad de PKN-beta se llevó a cabo una actividad de quinasa in vitro utilizando los precipitados inmunes como se describe anteriormente. La mitad de los precipitados se sometió a la reacción de quinasa in vitro, la segunda mitad se analizó mediante análisis de transferencia de Western utilizando anticuerpos anti-fosfo-PRK. El filtro se peló y se volvió a probar utilizando el antisuero anti-PKN-beta. Los niveles de Quinasa p70 S6 se analizaron a partir de los alícuotas de lisados celulares, que se retiraron inicialmente, para confirmar la eficacia del

tratamiento de LY294002 incluso solo después de un tratamiento de 3 horas. Se obtuvo el anticuerpo anti-fosfo p70 de señalización Celular.

5 Como se puede observar de la Figura 12, el tratamiento con LY294002 lleva a una fuerte inhibición de la actividad de quinasa de PKNbeta, medida nuevamente aquí mediante fosforilación de MBP. Este efecto fue visible solo después de 3 horas de tratamiento, en una actividad de PKNbeta de 24 horas casi se inhibieron completamente. La fosforilación de PKNbeta en la posición 718 también se comprometió después de la inhibición de PI 3-quinasa por LY294002, sin embargo, este efecto fue menos pronunciado que el efecto de la actividad de quinasa.

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

10 La KE derivada de PKN-beta sirve como control deficiente de quinasa como se describe anteriormente. Su estado de Fosforilación también se vio afectado en cierto grado por el tratamiento con LY294002. Esto indica que la quinasa, que es responsable de la fosforilación de la PKNbeta en la posición 718, lo hace de forma dependiente de la PI 3-quinasa.

15 De forma más importante, este experimento muestra que la PKNbeta no se regula solo por la PI 3-quinasa mediante su nivel de expresión (véase las Figuras 3 y 12), también se regula en su nivel de activación. Estos hallazgos indican que la PKNbeta representa un objetivo en dirección 3' "perfecto" para la interferencia con una ruta de PI 3-quinasa hiperactiva para intervención terapéutica, dado que es exquisitamente dependiente de la PI 3-quinasa que se regula a diversos niveles. Esto permite la generación de compuestos los cuales exhiben un efecto distinto tanto en la proteína PKN-beta como en el ácido nucleico que codifica la misma. Aún más importante, esta clase de modulación de actividad de PKN-beta en la traducción en lugar del nivel de transcripción, es decir, a nivel de la proteína expresada, parece ser más prominente y duradera que el impacto a nivel de transcripción.

El método de filtración adicional de acuerdo con la presente invención se basa en esta búsqueda particular y utiliza preferiblemente la prueba de quinasa in vitro radioactiva o no radioactiva según la lectura de salida.

Ejemplo 14: Señales de localización de PKN-beta

25 En este experimento la localización de diversos derivados de PKN-beta se comparó con la localización de PKN-beta de tipo silvestre. La Figura 14 muestra imágenes, mediante las cuales la distribución celular de PKNbeta y los derivados de la misma tales como PKNbeta de tipo silvestre (Figura 14A), TA derivada de PKN beta (Figura 14B), KE derivada de PKN beta (Figura 14C) y deltaN de PKN beta (Figura 14D) se investigaron mediante microscopía de fluorescencia confocal. Los derivados recombinantes etiquetados con HA de PKNbeta se expresaron transitoriamente en células HeLa durante 48 horas. Después de fijación y permeabilización, se detectó la expresión de las proteínas recombinantes utilizando un anticuerpo anti- HA seguido por un anticuerpo de anti-ratón conjugado con FITC. Las células se contratiñeron al marcar la actina citoesquelética con rodamina-faloidina.

35 Los resultados se representan en las Figuras 14A a 14D, por lo que la imagen respectiva en cada lado izquierdo del dúplex de imágenes se relaciona con una imagen de células después de excitación específica a FITC y la imagen derecha ilustra las mismas células después de excitación utilizando una longitud de onda específica para la rodamina-faloidina. El teñido de FITC indica las células transfectadas con la proteína recombinante respectiva. El teñido de Rodamina-faloidina muestra células transfectadas y no transfectadas.

40 Como se puede observar de la Figura 14A, la PKNbeta de tipo silvestre se ubica predominantemente en el núcleo de las células. El mutante del sitio de fosforilación de TA de PKN-beta y el mutante de KE, ambos son deficientes de quinasa, y no se concentran más dentro del núcleo en comparación con la PKNbeta de tipo silvestre, sino que se dispersan sobre toda la célula. Finalmente, como se representa en la Figura 14D, el derivado ΔN de PKN-beta, que carece del tercer terminal N de la molécula y también tiene quinasa defectuosa (véase Figura 9), se excluye esencialmente del núcleo.

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

45 Las características de la presente invención descritas en la especificación, listado de secuencias, reivindicaciones y/o dibujos pueden separadamente y en cualquier combinación de los mismos ser material para realizar la invención en diversas formas de la misma.

Listado de Secuencias

<110> Silence Therapeutics AG
<120> Uso adicional de proteína quinasa N beta
<130> A 19015 PCT-EP/A
5 <150> EP 02018572.4
<151> 2002-08-14
<150> US 60/409,570
<151> 2002-09-11
<170> PatentIn version 3.1
10 <210> 1
<211> 889
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
15 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
<222> (1).. (889)
<223> proteína quinasa N beta (PKN beta)
<400>

ES 2 564 830 T3

Met Glu Glu Gly Ala Pro Arg Gln Pro Gly Pro Ser Gln Trp Pro Pro
 1 5 10 15

Glu Asp Glu Lys Glu Val Ile Arg Arg Ala Ile Gln Lys Glu Leu Lys
 20 25 30

Ile Lys Glu Gly Val Glu Asn Leu Arg Arg Val Ala Thr Asp Arg Arg
 35 40 45

His Leu Gly His Val Gln Gln Leu Leu Arg Ser Ser Asn Arg Arg Leu
 50 55 60

Glu Gln Leu His Gly Glu Leu Arg Glu Leu His Ala Arg Ile Leu Leu
 65 70 75 80

Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Ala Glu Pro Val Ala Ser Gly Pro Arg
 85 90 95

Pro Trp Ala Glu Gln Leu Arg Ala Arg His Leu Glu Ala Leu Arg Arg
 100 105 110

Gln Leu His Val Glu Leu Lys Val Lys Gln Gly Ala Glu Asn Met Thr
 115 120 125

ES 2 564 830 T3

His Thr Cys Ala Ser Gly Thr Pro Lys Glu Arg Lys Leu Leu Ala Ala
 130 135 140

Ala Gln Gln Met Leu Arg Asp Ser Gln Leu Lys Val Ala Leu Leu Arg
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 564 830 T3

Phe Leu Arg Leu Glu Asp Phe Leu Asp Asn Ala Cys His Gln Leu Ser
 385 390 395 400
 Leu Ser Leu Val Pro Gln Gly Leu Leu Phe Ala Gln Val Thr Phe Cys
 405 410 415
 Asp Pro Val Ile Glu Arg Arg Pro Arg Leu Gln Arg Gln Glu Arg Ile
 420 425 430
 Phe Ser Lys Arg Arg Gly Gln Asp Phe Leu Arg Arg Ser Gln Met Asn
 435 440 445
 Leu Gly Met Ala Ala Trp Gly Arg Leu Val Met Asn Leu Leu Pro Pro
 450 455 460
 Cys Ser Ser Pro Ser Thr Ile Ser Pro Pro Lys Gly Cys Pro Arg Thr
 465 470 475 480
 Pro Thr Thr Leu Arg Glu Ala Ser Asp Pro Ala Thr Pro Ser Asn Phe
 485 490 495
 Leu Pro Lys Lys Thr Pro Leu Gly Glu Glu Met Thr Pro Pro Pro Lys
 500 505 510
 Pro Pro Arg Leu Tyr Leu Pro Gln Glu Pro Thr Ser Glu Glu Thr Pro
 515 520 525
 Arg Thr Lys Arg Pro His Met Glu Pro Arg Thr Arg Arg Gly Pro Ser
 530 535 540
 Pro Pro Ala Ser Pro Thr Arg Lys Pro Pro Arg Leu Gln Asp Phe Arg
 545 550 555 560
 Cys Leu Ala Val Leu Gly Arg Gly His Phe Gly Lys Val Leu Leu Val
 565 570 575
 Gln Phe Lys Gly Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Ile Lys Ala Leu Lys Lys
 580 585 590
 Gln Glu Val Leu Ser Arg Asp Glu Ile Glu Ser Leu Tyr Cys Glu Lys
 595 600 605
 Arg Ile Leu Glu Ala Val Gly Cys Thr Gly His Pro Phe Leu Leu Ser
 610 615 620
 Leu Leu Val Cys Phe Gln Thr Ser Ser His Ala Arg Phe Val Thr Glu
 625 630 635 640

ES 2 564 830 T3

Phe Val Pro Gly Gly Asp Leu Met Met Gln Ile His Glu Asp Val Phe
645 650 655

Pro Glu Pro Gln Ala Arg Phe Tyr Val Ala Cys Val Val Leu Gly Leu
660 665 670

Gln Phe Leu His Glu Lys Lys Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Asp
675 680 685

Asn Leu Leu Leu Asp Ala Gln Gly Phe Leu Lys Ile Ala Asp Phe Gly
690 695 700

Leu Cys Lys Glu Gly Ile Gly Phe Gly Asp Arg Thr Ser Thr Phe Cys
705 710 715 720

Gly Thr Pro Glu Phe Leu Ala Pro Glu Val Leu Thr Gln Glu Ala Tyr
725 730 735

Thr Gln Ala Val Asp Trp Trp Ala Leu Gly Val Leu Leu Tyr Glu Met
740 745 750

Leu Val Gly Glu Cys Pro Phe Pro Gly Asp Thr Glu Glu Glu Val Phe
755 760 765

Asp Cys Ile Val Asn Met Asp Ala Pro Tyr Pro Gly Phe Leu Ser Val
770 775 780

Gln Gly Leu Glu Phe Ile Gln Lys Leu Leu Gln Lys Cys Pro Glu Lys
785 790 795 800

Arg Leu Gly Ala Gly Glu Gln Asp Ala Glu Glu Ile Lys Val Gln Pro
805 810 815

Phe Phe Arg Thr Thr Asn Trp Gln Ala Leu Leu Ala Arg Thr Ile Gln
820 825 830

Pro Pro Phe Val Pro Thr Leu Cys Gly Pro Ala Asp Leu Arg Tyr Phe
835 840 845

Glu Gly Glu Phe Thr Gly Leu Pro Pro Ala Leu Thr Pro Pro Ala Pro
850 855 860

His Ser Leu Leu Thr Ala Arg Gln Gln Ala Ala Phe Arg Asp Phe Asp
865 870 875 880

Phe Val Ser Glu Arg Phe Leu Glu Pro

885

<211> 2670

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> mARN

<222> (1).. (2670)

<223> mARN/cADN de PKN beta

<400> 2

ES 2 564 830 T3

atggaggagg	gggcgccg	gcagcctggg	ccgagccagt	ggccccaga	ggatgagaag	60
gaggtgatcc	gccgggcat	ccagaaagag	ctgaagatca	aggaggggg	ggagaacctg	120
cggcgctgg	ccacagaccg	ccgccacttg	ggccatgtgc	agcagctgct	gcggtcctcc	180
aaccgccgcc	tggagcagct	gcatggcgag	ctgcgggagc	tgcacgccc	aatcctgctg	240
cccggccctg	ggcctggccc	agctgagcct	gtggcctcag	gaccccgcc	gtgggcagag	300
cagctcaggg	ctcggcacct	agaggctctc	cggaggcagc	tgcagtgga	gctgaagggtg	360
aaacaggggg	ctgagaacat	gacccacacg	tgcgccagtg	gcacccccaa	ggagaggaag	420
ctccttgca	ctgcccagca	gatgctgcgg	gacagccagc	tgaagggtgg	cctgctgcgg	480
atgaagatca	gcagcctgga	ggccagtggg	tccccggagc	cagggcctga	gctactggcg	540
gaggagctac	agcatcgact	gcacgttgag	gcagcgggtg	ctgagggcgc	caagaacctg	600
gtgaaactgc	ttagtagccg	gagaacacag	gaccgcaagg	cactggctga	ggcccaggcc	660
cagctacagg	agtcctctca	gaaactggac	ctcctgcgcc	tggccttggg	gcagctgctg	720
gagcaactgc	ctcctgccc	ccctttgcgc	agcagagtga	cccagagatt	gcgggctgcg	780
gtgcctggat	acccccagcc	ttcagggaca	cctgtgaagc	ccaccgccct	aacagggaca	840
ctgcaggtcc	gcctcctggg	ctgtgaacag	ttgctgacag	ccgtgcctgg	gcgctcccc	900
gcggccgcac	tggccagcag	cccctccgag	ggctggcttc	ggaccaaggc	caagcaccag	960
cgtggccgag	gcgagcttgc	cagtgaggtg	ctggctgtgc	taaagggtgga	caaccgtggt	1020
gtggggcaga	cgggctgggg	gcaggtggcc	gaacagtcct	gggaccagac	ctttgtcatc	1080
ccactggagc	gagcccgtga	gctggagatt	ggggtacact	ggcgggactg	gcggcagcta	1140
tgtggcgtgg	ccttctgag	acttgaagac	ttcctggaca	atgcctgtca	ccaactgtcc	1200
ctcagcctgg	taccgcaggg	actgcttttt	gccaggtga	ccttctgcga	tcctgtcatt	1260
gagagggcgc	cccggctgca	gaggcaggaa	cgcactctct	ctaaacgcag	aggccaggac	1320
ttcctgaggc	gttcgcagat	gaacctcggc	atggcggcct	gggggcgcct	cgatcatgaac	1380
ctgctgcccc	cctgcagctc	cccagacaca	atcagcccc	ctaaaggatg	ccctcggacc	1440

ES 2 564 830 T3

ccaacaacac tgcgagaggc ctctgaccct gccactceca gtaatttctt gcccaagaag 1500
 acccccttgg gtgaagagat gacacccccca cccaagcccc cacgcctcta cctccccag 1560
 gagccaacat ccgaggagac tccgcgcacc aaacgtcccc atatggagcc taggactcga 1620
 cgtgggccat ctccaccagc ctccccacc aggaaacccc ctcggttca ggacttccgc 1680
 tgcttagctg tgctgggccc gggacacttt ggaaggtcc tcttggcca gttcaagggg 1740
 acagggaaat actacgcat caaagcactg aagaagcagg aggtgctcag ccgggacgag 1800
 atagagagcc tgtactgca gaagcggatc ctggaggctg tgggctgcac agggcacct 1860
 ttctgtctt cctccttgt ctgctccag acctccagcc atgcccgtt tgtgactgag 1920
 tttgtgcctg gtggtgacct catgatgcag atccacgagg atgtctccc cgagccccag 1980
 gcccgttct acgtggttg tgttgctctg gggctgcagt tcttacacga gaagaagatc 2040
 attacaggg acctgaagt ggataacct ctgctggatg ccaggatt cctgaagatc 2100
 gcagactttg gactctgca ggaagggatc ggttcgggg accggactag caccttctgt 2160
 ggcaccccg agttcctggc tcccgagggt ctgaccaggg aggcatacac acaggccgtc 2220
 gactggtggg cgctgggtgt gctgctctac gagatgctgg tgggtgagt cccgttccca 2280
 ggggacacag aggaagaggt gtttgactgc atcgtcaaca tggacgcccc ctaccccggc 2340
 tttctgtcgg tgcaagggct tgagttcatt cagaagctcc tccagaagt cccggagaag 2400
 cgctcgggg caggtgagca ggatgccgag gagatcaagg tccagcatt cttcaggacc 2460
 accaactggc aagccctgct cgcccgcacc atccagcccc cttctgtgcc taccctgtgt 2520
 ggccctgcgg acctgcgcta ctttgagggc gagttcacag ggctgccgcc tgcctgacc 2580
 ccacctgcac cccacagcct cctcactgcc cgccaacagg ccgcttccg ggacttcgac 2640
 tttgtgtcag agcattcct ggaaccctga 2670

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido

<220>

<221> características_misc

10 <222> (1).. (6)

<223> ARN

<220>

<221> características_misc

<222> (7).. (15)

<223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato

5 <220>

<221> características_misc

<222> (16).. (21)

<223> ARN

<400> 3

10 **ggaggguccag tttctgagag g**

21

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> oligonucleótido antisentido

<220>

<221> características_misc

<222> (1).. (6)

20 <223> ARN

<220>

<221> características_misc

<222> (7).. (15)

<223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato

25 <220>

<221> características_misc

<222> (16).. (21)

<223> ARN

<400> 4

30 **uguuucacct tcaguccac a**

21

<210> 5

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> oligonucleótido antisentido

<220>

<221> características_misc

<222> (1).. (7)

<223> ARN

10 <220>

<221> características_misc

<222> (8).. (16)

<223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato

<220>

15 <221> características_misc

<222> (17)..(23)

<223> ARN

<400> 5

aggacaacac aagccacgua gaa

23

20 <210>6

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> oligonucleótido antisentido

<220>

<221> características_misc

<222> (1).. (7)

<223> ARN

30 <220>

<221> características_misc

- <222> (8).. (16)
 <223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato
 <220>
 <221> características_misc
- 5 <222> (17).. (23)
 <223> ARN
 <400> 6
gcucugacac aaagtcgaag ucc **23**
- 10 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 15 <223> oligonucleótido antisentido
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1) .. (7)
 <223> ARN
- 20 <220>
 <221> características_misc
 <222> (8).. (16)
 <223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato
 <220>
- 25 <221> características_misc
 <222> (17).. (23)
 <223> ARN
 <400> 7
gcagucaaac acctctuccu cug **23**
- 30 <210> 8
 <211> 21

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido antisentido
5 <220>
<221> características_misc
<222> (11).. (6)
<223> ARN
<220>
10 <221> características_misc
<222> (7).. (15)
ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato
<220>
<222> características_misc
15 <222> (16) .. (21)
<223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato
<400> 8
caacacggtt gtccaccuuu a
<210> 9
20 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> oligonucleótido antisentido
25 <220>
<221> características_misc
<222> (1).. (6)
<223> ARN
<220>
30 <221> características_misc
<222> (7).. (15)

21

<223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (16).. (21)
 5 <223> ARN
 <400> 9
ucagugcttt gatggegguag u **21**
 <210> 10
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <220>
 15 <221> características_misc
 <222> (1).. (6)
 <223> ARN
 <220>
 <221> características_misc
 20 <222> (7) .. (15)
 <223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (16).. (21)
 25 <223> ARN
 <400> 10
cuucucgcag tacaggcucu c **21**
 <210> 11
 <211> 21
 30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <220>
 5 <221>características_misc
 <222> (1).. (6)
 <223> ARN
 <220>
 <221> características_misc
 10 <222> (7).. (15)
 <223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (16).. (21)
 15 <223> ARN
 <400> 11
caagacgctt gtgcacguuu a
 <210> 12
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <220>
 25 <221> características_misc
 <222> (1) .. (6)
 <223> ARN
 <220>
 <221> características_misc
 30 <222> (7).. (15)
 <223> ADN ligado a través de enlaces de fosforotioato

21

<220>

<221> características_misc

<222> (16).. (21)

<223> ARN

5 <400> 12

ucagagctta gttggcguug u

21

REIVINDICACIONES

1. Uso de la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo.
- 5 2. Una proteína quinasa N beta, o un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para uso en un método para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la proteína quinasa N beta tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1.
- 10 4. Uso de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, o un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo.
5. Un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta, o un fragmento de la misma, en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para uso en el diagnóstico de un tumor de etapa tardía, in vivo.
- 15 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 o el ácido nucleico para uso de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque la proteína quinasa N beta tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO. 1.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 o el ácido nucleico para uso de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el ácido nucleico es un ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO. 2.
- 20 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la proteína quinasa N beta o fragmento de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la proteína quinasa N beta es codificada por un ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO. 2.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 o el ácido nucleico para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la secuencia de ácidos nucleicos, excepto para la degeneración del código genético, se hibridaría al ácido nucleico como se especifica en la reivindicación 4 y 5.
- 25 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 en donde la secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia nucleica que se hibrida bajo condiciones rigurosas a la secuencia de ácidos nucleicos o parte de la misma, de acuerdo con la SEQ ID NO. 2.
- 30 11. El uso, la proteína quinasa N beta o el ácido nucleico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el tumor de etapa tardía se caracteriza de tal manera que las células que están involucradas en dicho tumor de etapa tardía carecen de actividad PTEN o muestran un aumento en el comportamiento agresivo.
- 35 12. Uso de un ácido nucleico que inhibe un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, en donde dicha parte realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un tumor de etapa tardía, en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, una ribozima, aptámeros, espiegélmeros o siARN.
13. Uso de un ácido nucleico que inhibe la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, en donde dicha parte realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para la fabricación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo, en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, una ribozima, aptámeros, espiegélmeros o siARN.
- 40 14. Un ácido nucleico que inhibe la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, en donde dicha parte realiza el efecto de proteína quinasa N beta, para uso en un método para el tratamiento de un tumor de etapa tardía, en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, una ribozima, aptámeros, espiegélmeros o siARN.
- 45 15. Un ácido nucleico que inhibe la proteína quinasa N beta o una parte de la misma, para uso en un método para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía in vivo, en donde el ácido nucleico que interactúa es un oligonucleótido antisentido, una ribozima, aptámeros, espiegélmeros o siARN.
16. Un método para la detección de un agente para el tratamiento de un tumor de etapa tardía y/o para la fabricación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un compuesto candidato,
- b) proporcionar un sistema de expresión para la proteína quinasa N beta y/o un sistema que detecta la actividad de la proteína quinasa N beta;
- 5 c) poner en contacto el compuesto candidato con el sistema de expresión para la proteína quinasa N beta y/o el sistema que detecta actividad de la proteína quinasa N beta;
- d) determinar si la expresión y/o la actividad de proteína quinasa N beta se cambia bajo la influencia del compuesto candidato.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el compuesto candidato se selecciona de péptidos, proteínas, anticuerpos, anticalinos, ácidos nucleicos funcionales, compuestos naturales y moléculas pequeñas.
- 10 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde los ácidos nucleicos funcionales se seleccionan de aptámeros, aptazimas, ribozimas, espejélmeros, oligonucleótidos antisentido y siARN.
19. Un método in vitro para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía que comprende el uso de la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta.
- 15 20. Un método in vitro para el diagnóstico de un tumor de etapa tardía que comprende el uso de un ácido nucleico que codifica la proteína quinasa N beta o un fragmento de la misma en donde dicho fragmento realiza el efecto de proteína quinasa N beta.

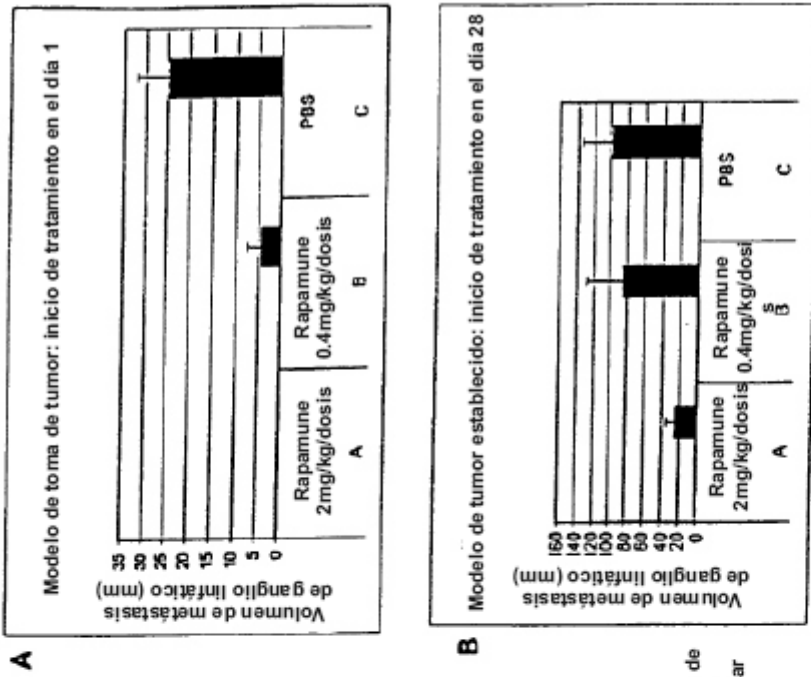


Fig. 2

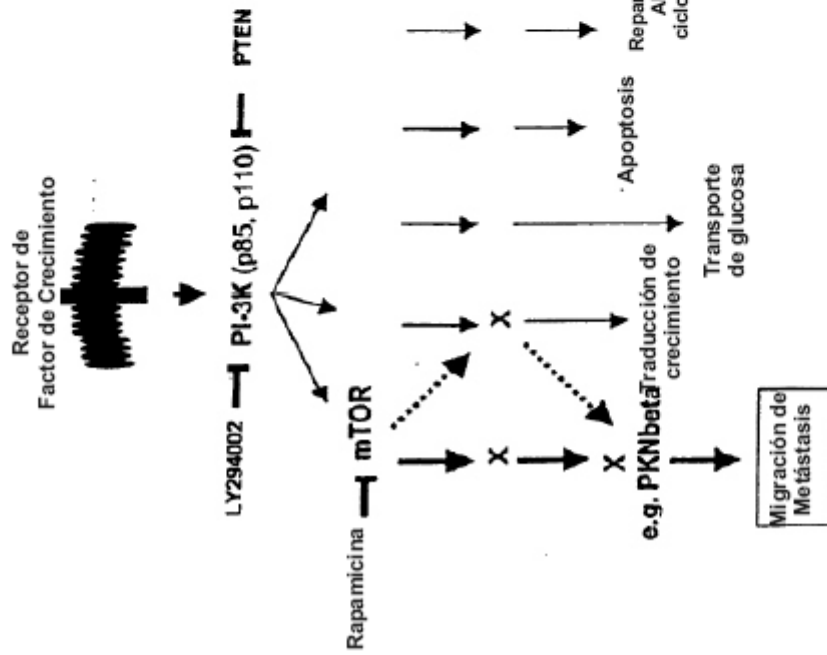


Fig. 1

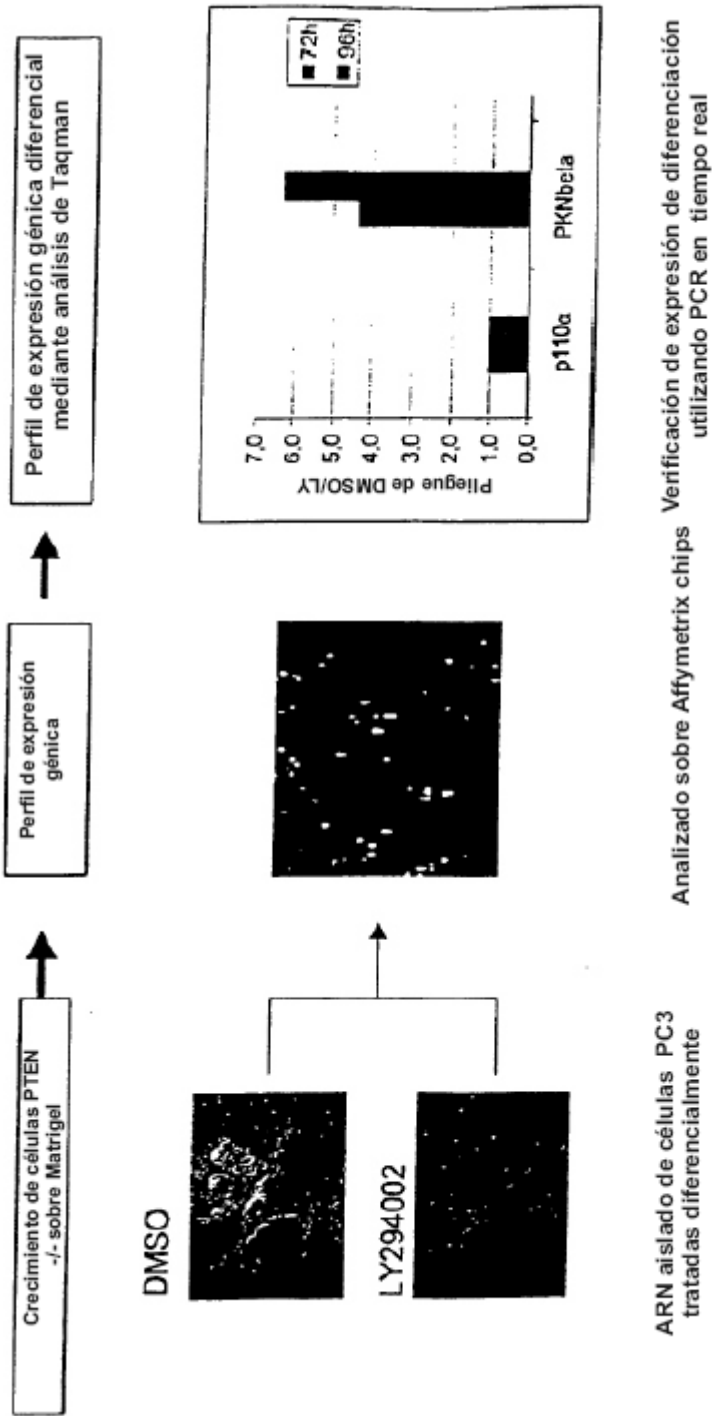


Fig. 3

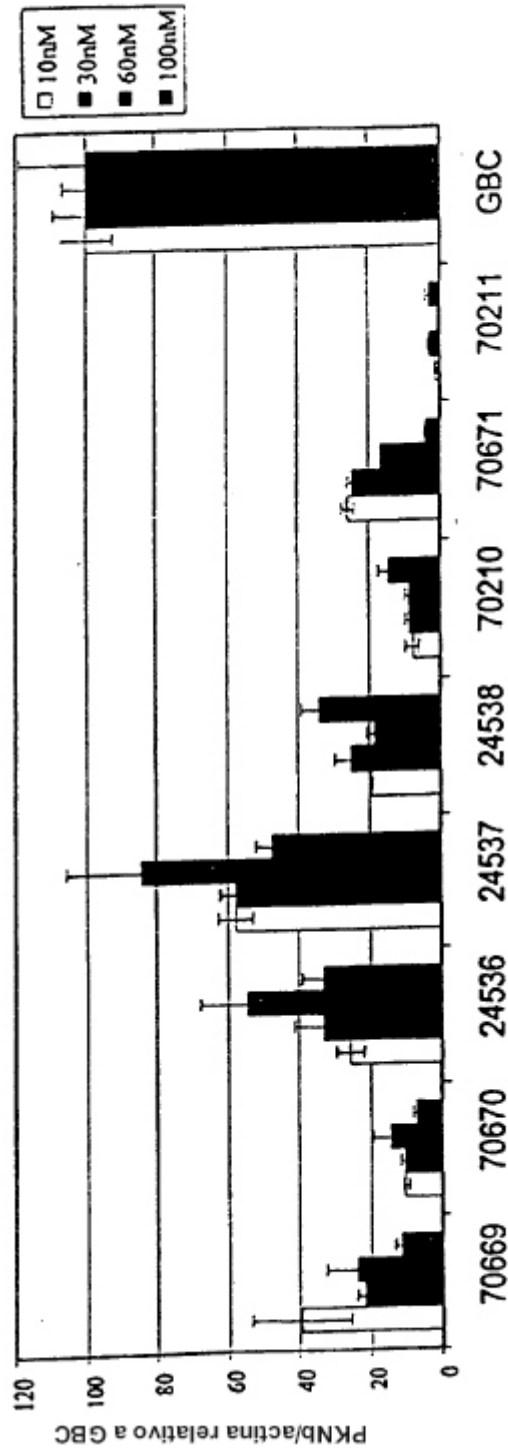


Fig. 4

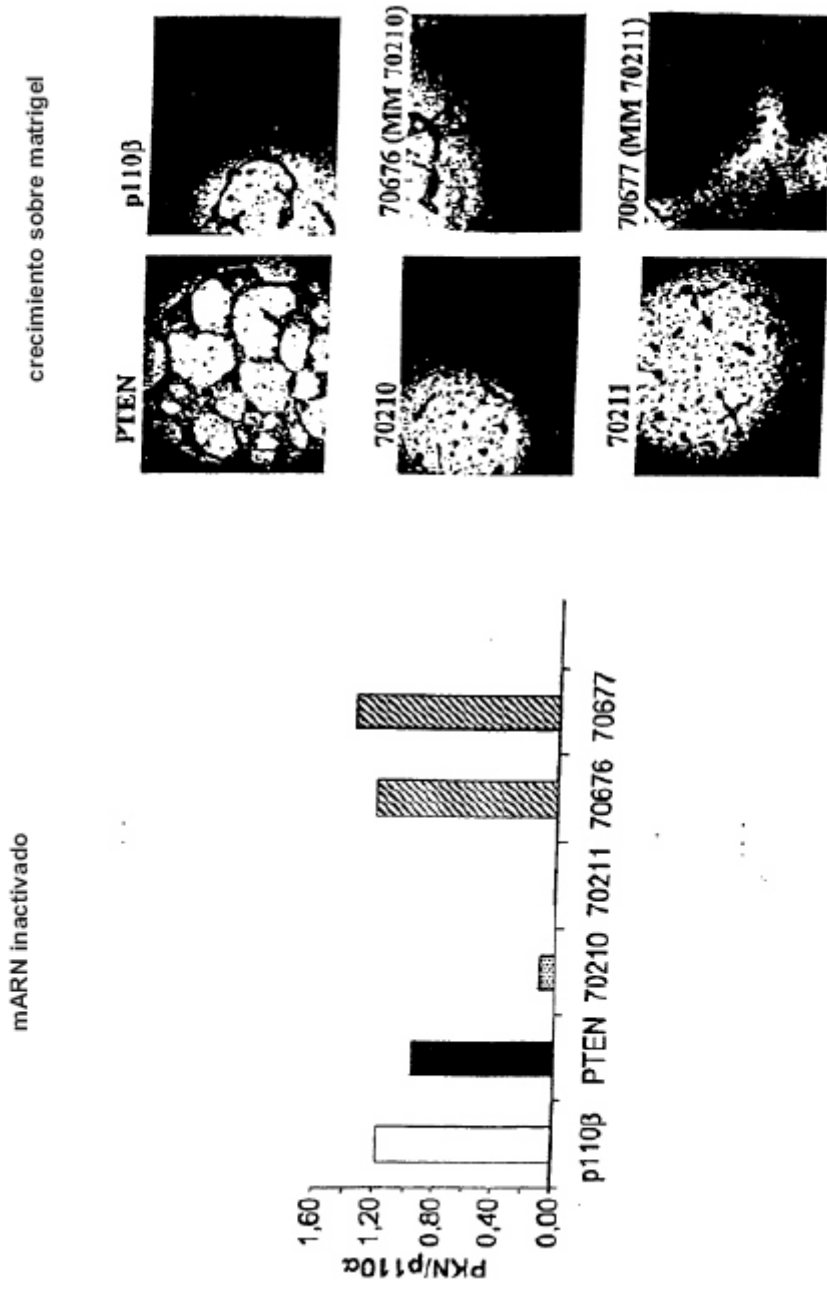


Fig. 5

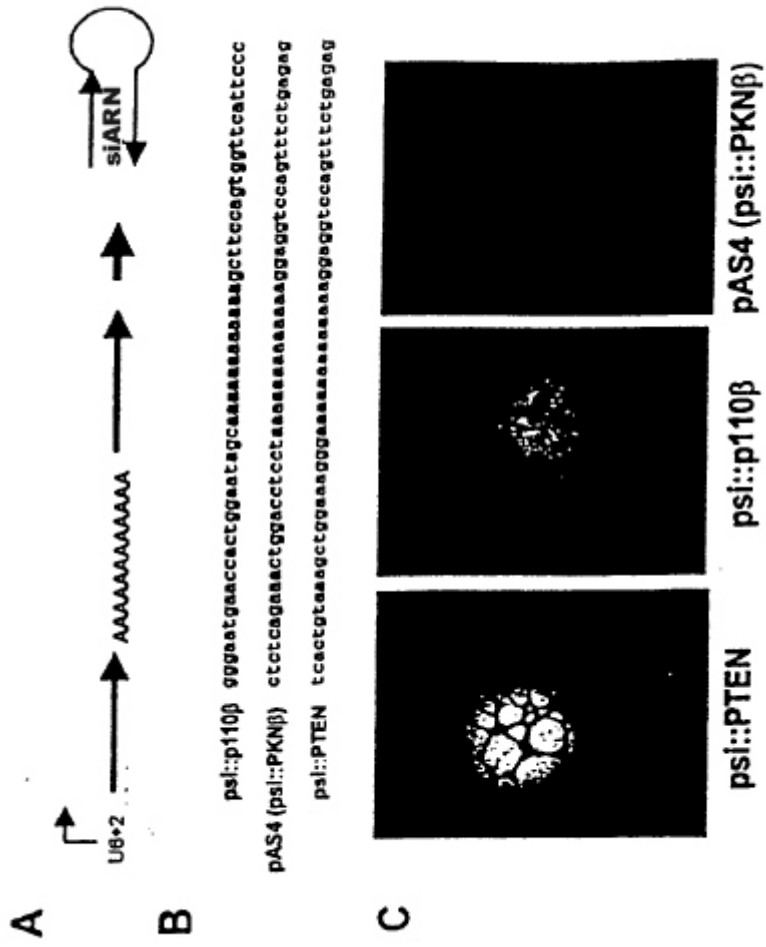


Fig.6

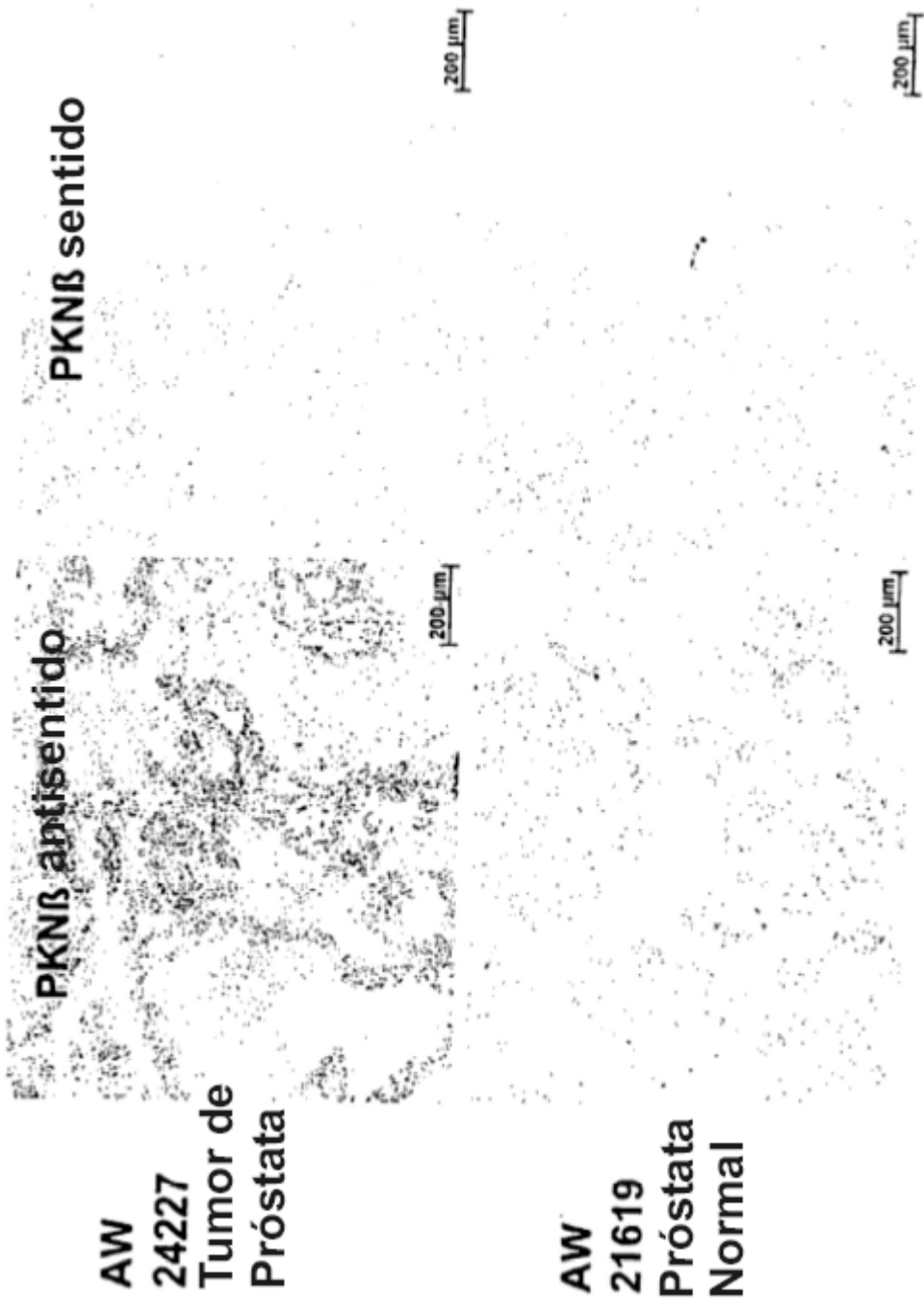


Fig. 7

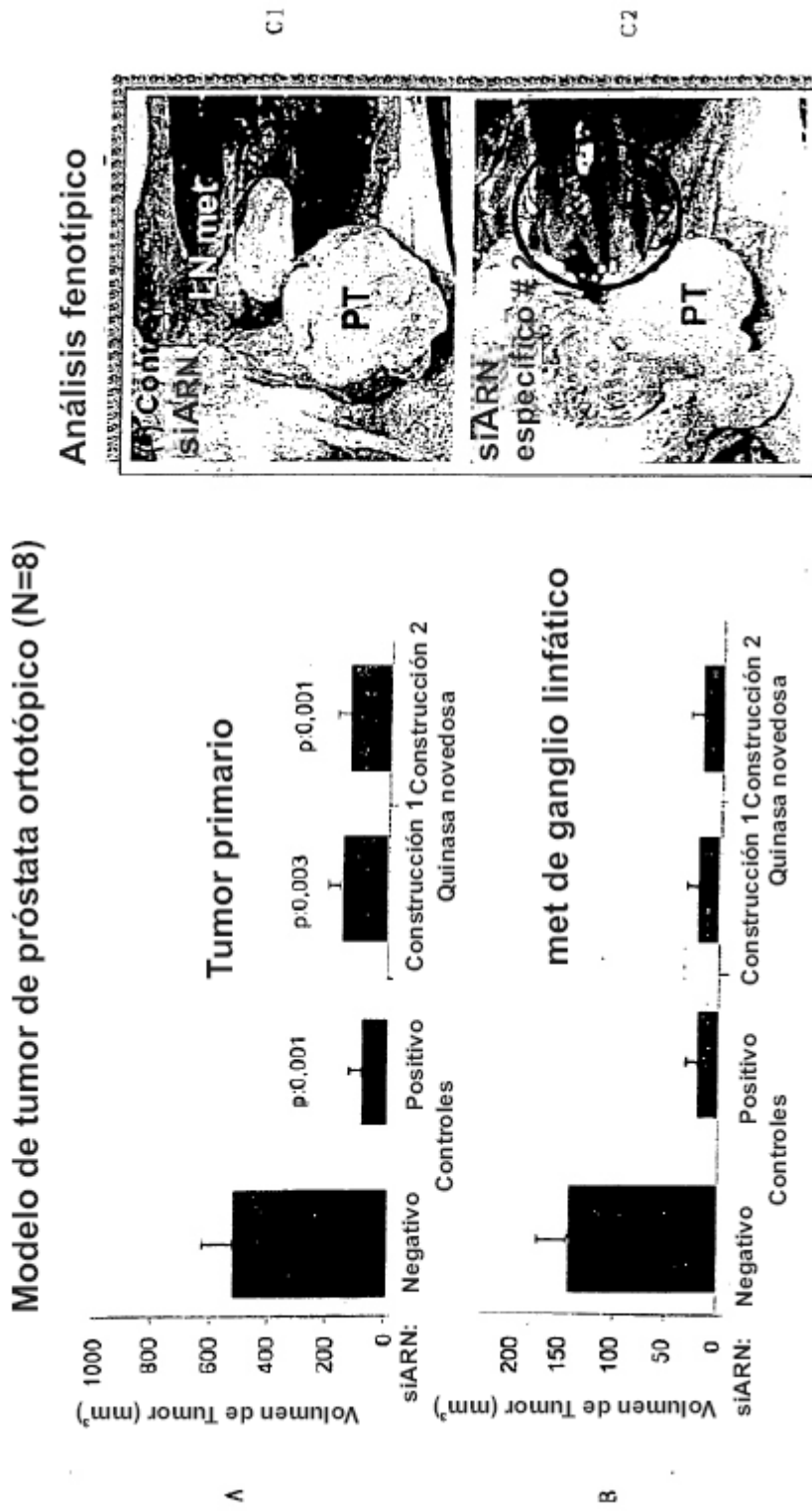


Fig. 8

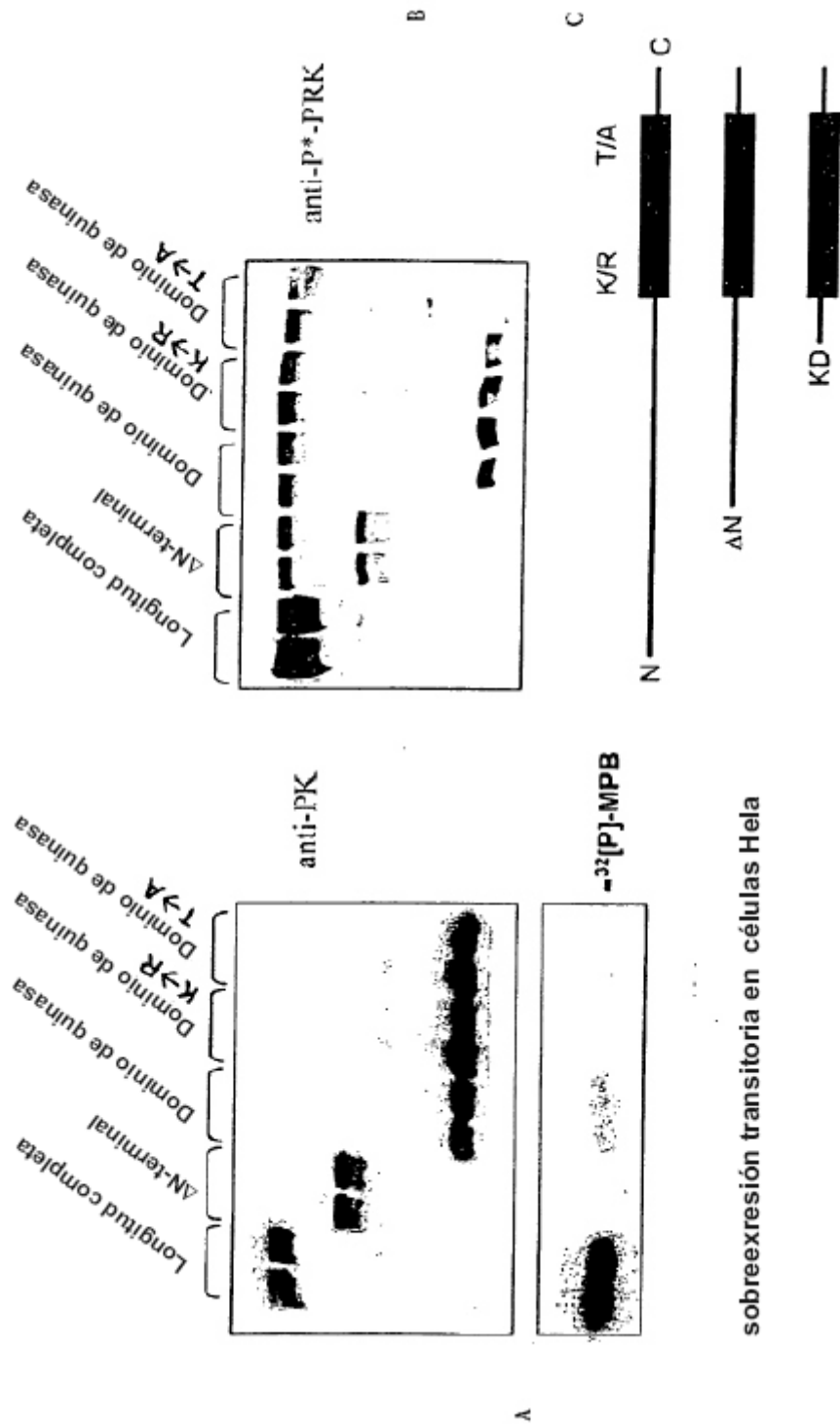


Fig. 9

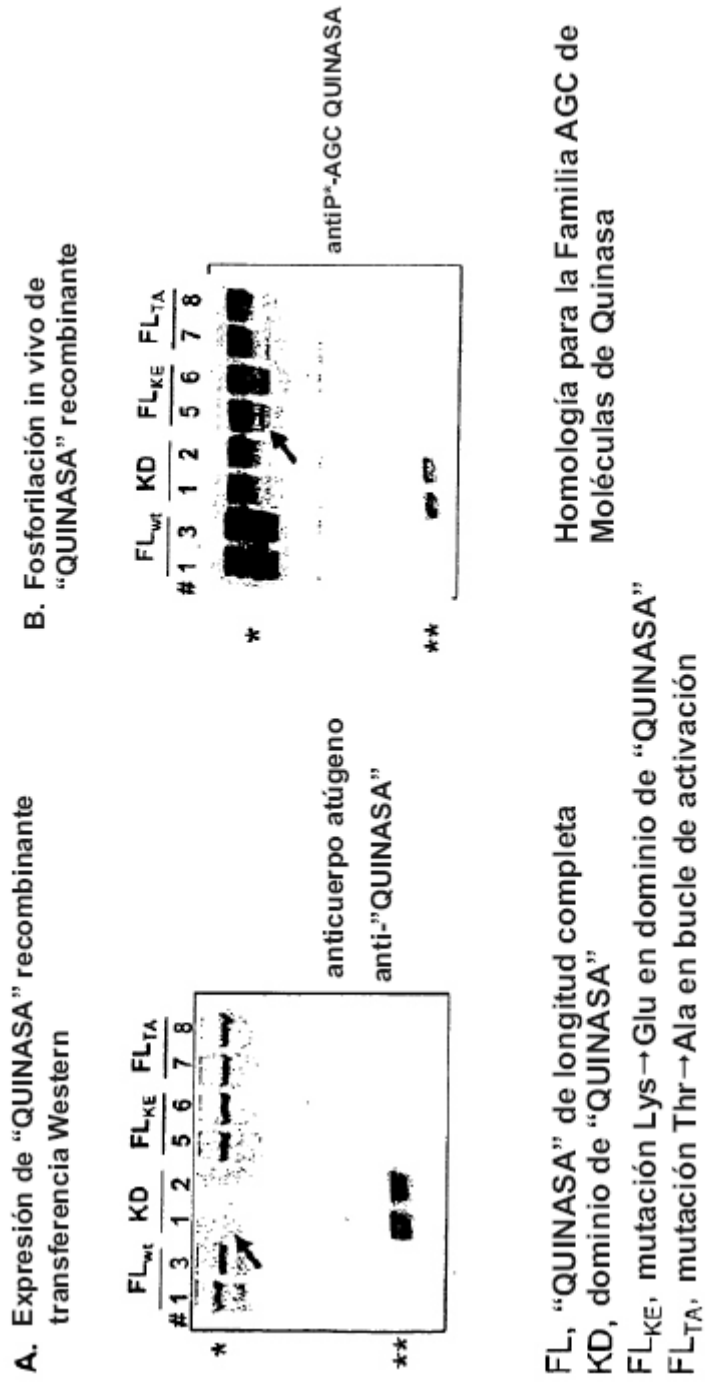


Fig. 10

Inmunoprecipitación anti-Myc tag/Ensayo de Quinasa In vitro:

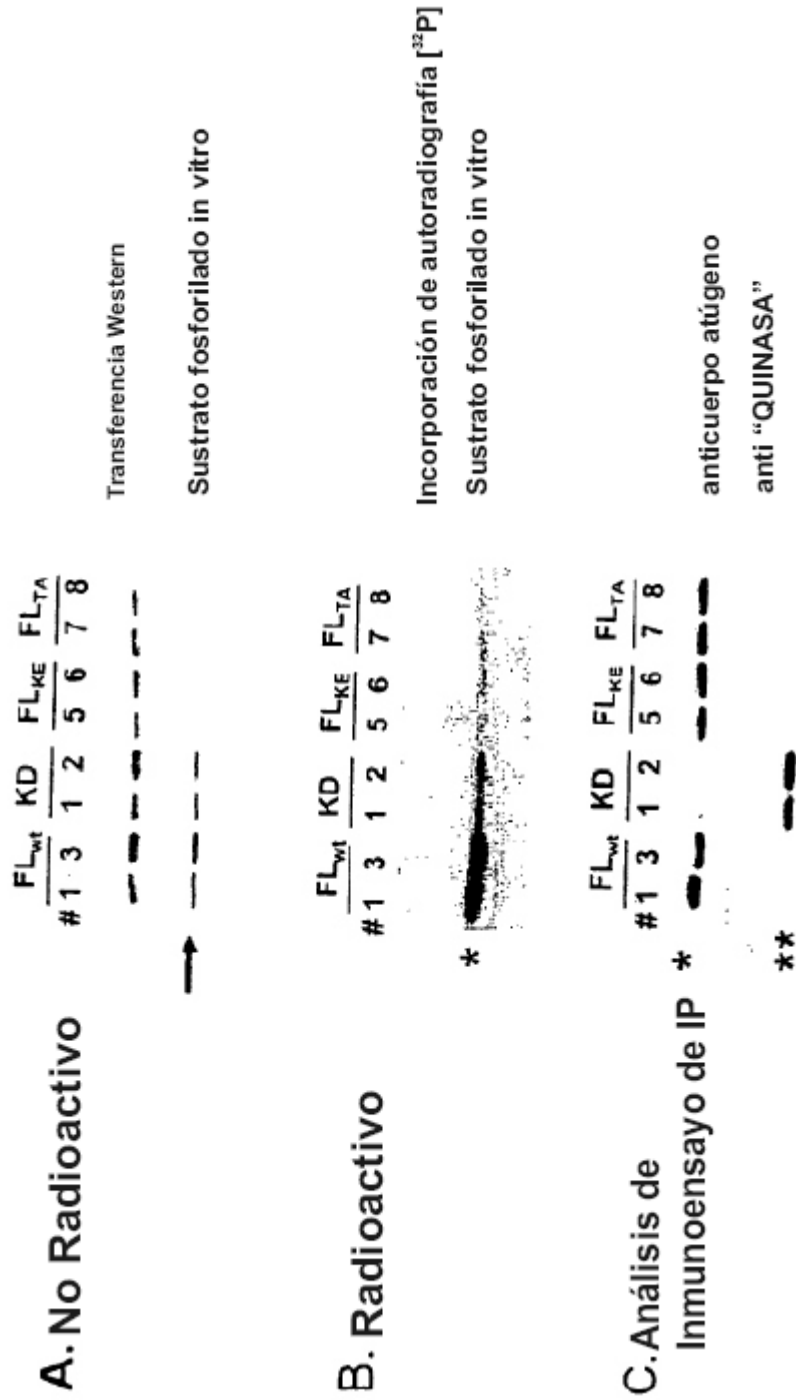


Fig. 11

Expresión de PK Dependiente de PI 3-quinasa

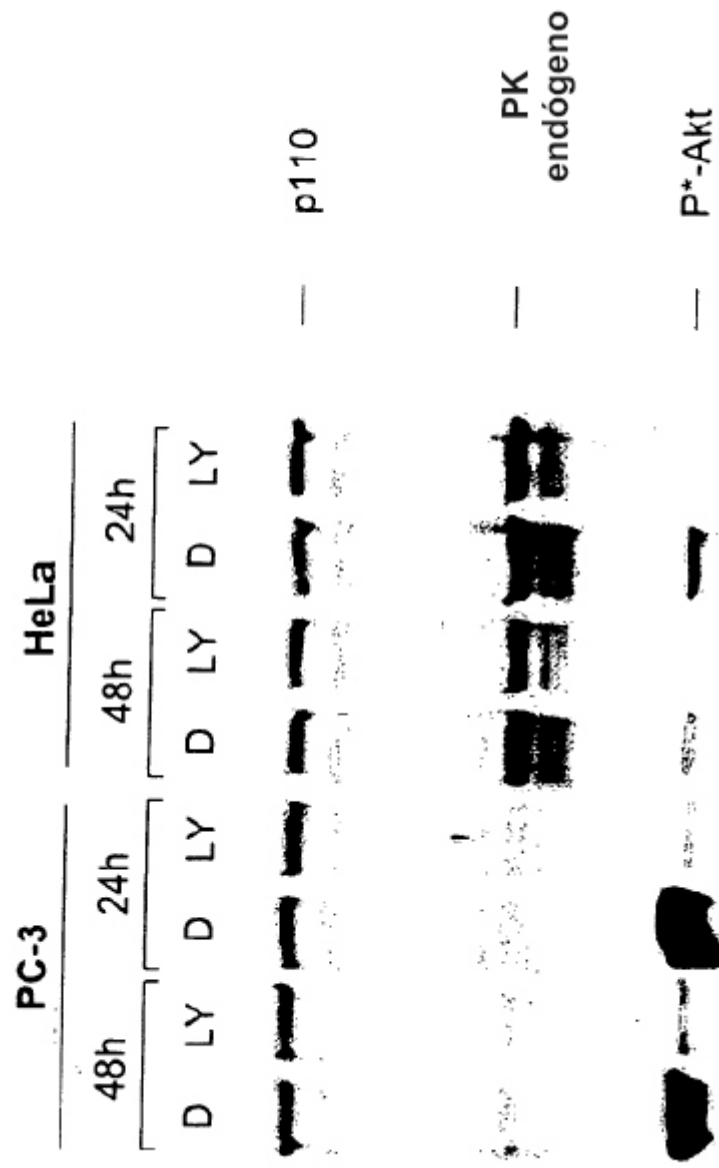
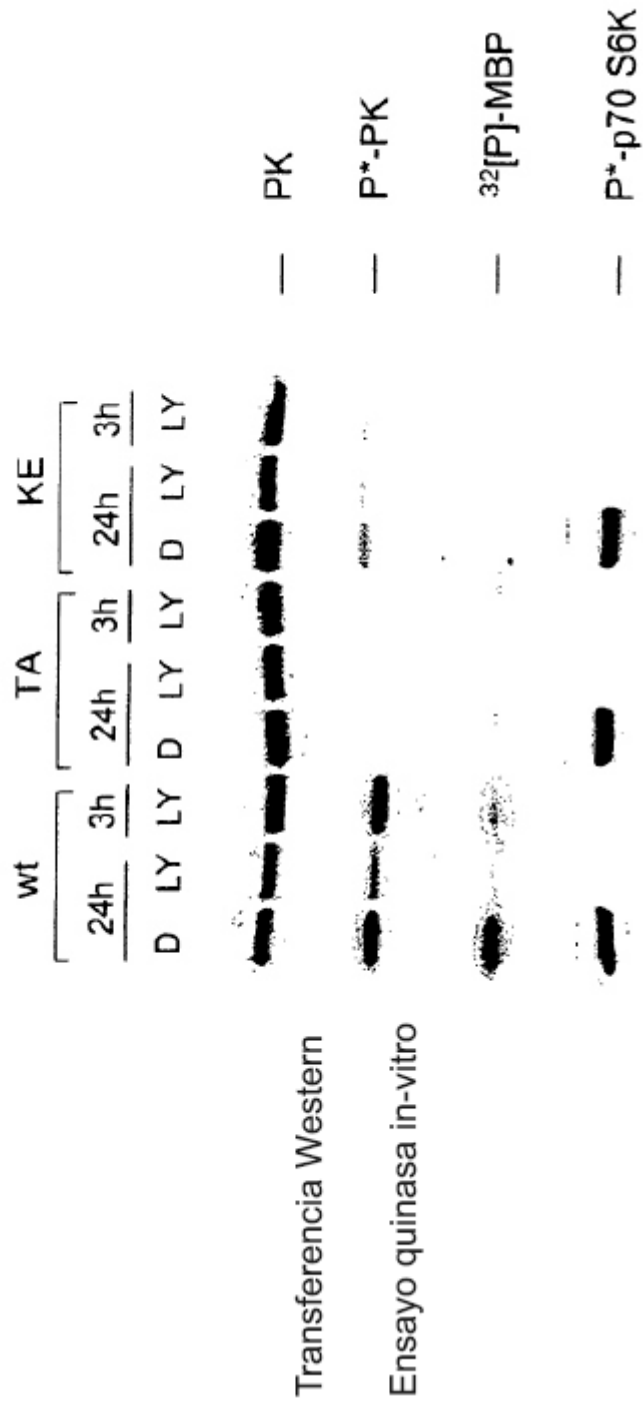


Fig. 12

Se requiere PI 3-quinasa para Actividad de PK



Transferencia Western
 Ensayo quinasa in-vitro

Fig. 13

Localización Nuclear de PK es Dependiente de la Actividad de Quinasa y terminal N

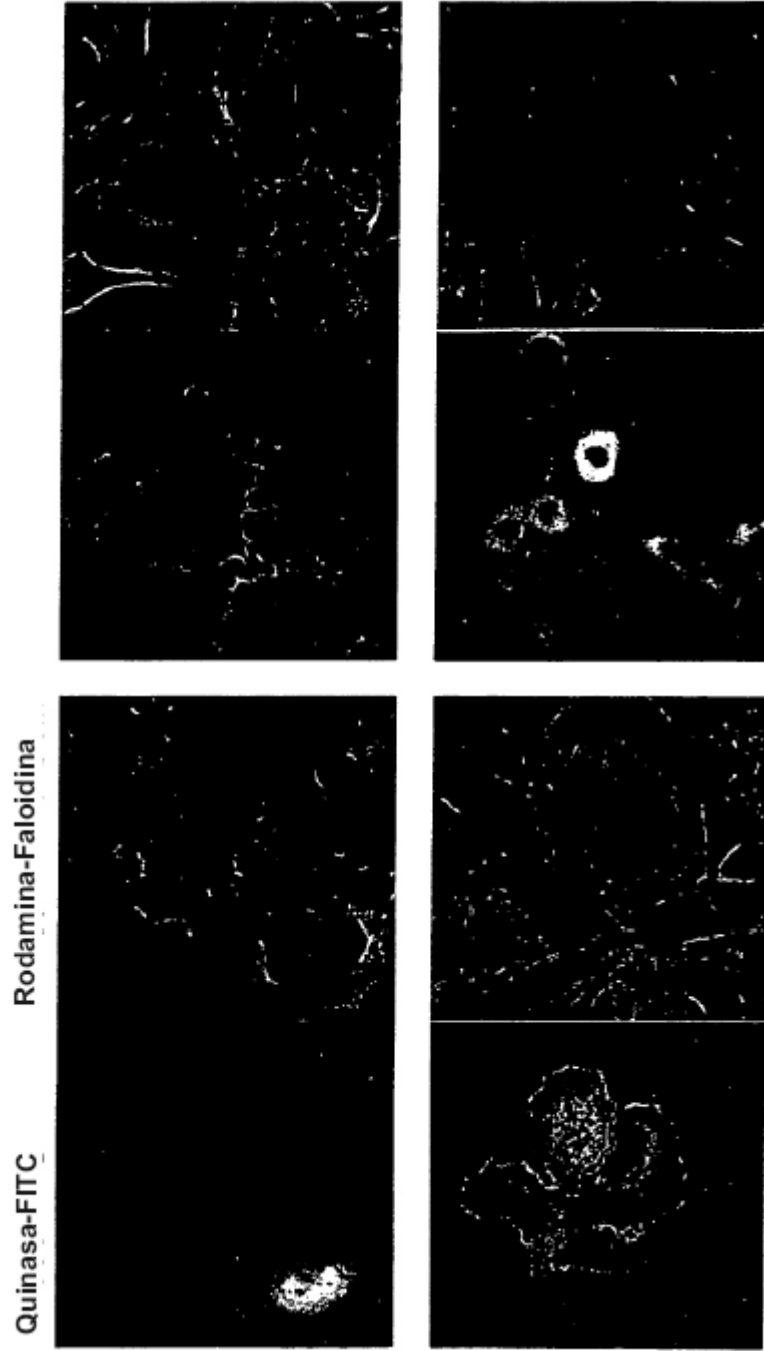


Fig. 14