

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 663**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2007 E 11162743 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2365335**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico**

30 Prioridad:

27.03.2006 GB 0606096

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

12.05.2016

73 Titular/es:

**ISIS INNOVATION LIMITED (100.0%)
University Offices Wellington Square
Oxford OX1 2JD, GB**

72 Inventor/es:

**LA THANGUE, NICHOLAS B y
FOTHERINGHAM, SUSAN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 569 663 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).

Procedimiento de diagnóstico

Descripción

5 Se divulga un nuevo procedimiento de cribado que identifica marcadores moleculares simples que son predictivos de si una afección particular responde a un tratamiento específico. Así, el procedimiento hace más eficientes los programas de desarrollo de fármacos e informa en cuanto a la manera en que un fármaco puede ser usado en un entorno clínico.

10 Una proporción significativa de los fármacos terapéuticos candidatos no llega a convertirse en fármacos comercializables debido a su metabolismo adverso o a su toxicidad, descubiertos durante las pruebas clínicas. Además, muchos fármacos que entran en el entorno clínico presentan una eficacia y una toxicidad limitantes. Estos fracasos representan un desperdicio muy significativo en gastos de desarrollo y, en consecuencia, existe la necesidad de nuevas tecnologías que puedan predecir de forma más fiable, rápida y económica, en la fase preclínica de desarrollo, las características metabólicas y toxicológicas de fármacos candidatos y su eficacia probable en la prevención o el tratamiento de una enfermedad.

15 El desarrollo de nuevas terapias es complicado y caro. Tomando el ejemplo del cáncer, esta es una enfermedad genética compleja para la que se ha demostrado que es difícil de dar con terapias de éxito. Además, en el contexto clínico, los tumores frecuentemente adquieren resistencia a nuevos tratamientos. Así, hay una gran necesidad de desarrollar pruebas simples que predigan la sensibilidad de los tumores a fármacos nuevos y existentes. Lo mismo se aplica a otras afecciones, particularmente a aquellas en las que la proliferación celular contribuye a la patología.

20 El documento WO 03/066885 divulga un procedimiento para cribar compuestos que tienen actividad inhibidora de HDAC y, en particular, el uso de niveles de Fra-1 como un marcador para la inhibición de HDAC. El documento WO 03/035843 describe un procedimiento para evaluar la respuesta de una célula cancerosa a un inhibidor de HDAC. El procedimiento implica determinar si la célula cancerosa es una célula que comprende ERBB2 amplificado o sobreexpresado, donde una célula que comprende ERBB2 amplificado o sobreexpresado se espera que sea más sensible a un inhibidor de HDAC que una célula en la que el ERBB2 está a un nivel normal.

Resumen de la invención

25 La invención proporciona un procedimiento para diagnosticar la susceptibilidad de un individuo que padece de una enfermedad al tratamiento con un inhibidor de HDAC, el procedimiento comprende evaluar el nivel de expresión o actividad de un gen o sus productos de expresión, o la secuencia de un gen, en una muestra de un paciente y comparar dicho nivel de expresión o actividad o secuencia con una referencia, en donde un nivel de expresión o actividad o secuencia que es diferente de dicha referencia es indicativa de una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC en relación al estado de referencia, y en donde dicho gen es hHRAD23B (rad 23B humano).

30 La divulgación proporciona un procedimiento para la identificación de un biomarcador que se correlaciona con la sensibilidad de una enfermedad a un fármaco, comprendiendo el procedimiento:

- 45 a) la exposición de una célula a:
 - i) el fármaco;
 - ii) un compuesto que inhibe el nivel o actividad de una proteína en la célula;
- 50 b) monitorizar el fenotipo en la célula;

en el que la presencia del fenotipo en una célula que difiere del fenotipo evidente cuando la población de células es tratada solo con el fármaco identifica a la proteína o su gen codificante como un biomarcador que se correlaciona con la sensibilidad a un fármaco.

55 El cribado permite identificar biomarcadores de enfermedades. El tipo de biomarcador que puede ser identificado predice la sensibilidad de la enfermedad a fármacos nuevos o existentes y, así, permite la estratificación de pacientes en grupos con respuesta probable y sin respuesta. Estos biomarcadores mejorarán la probabilidad de éxito clínico durante el desarrollo del fármaco y maximizarán el beneficio terapéutico al paciente “diseñando a medida” la terapia a la enfermedad.

60 La invención es particularmente aplicable a condiciones proliferativas como el cáncer y a enfermedades que implican un cambio en la diferenciación celular o la tasa de crecimiento. Sin embargo, cualquier enfermedad que exprese un biomarcador identificado según la invención es candidata al tratamiento con el fármaco objeto de ensayo.

65 La tecnología de la invención está idealmente adaptada a fármacos en los que la vía para alcanzar la

máxima eficacia clínica es poco clara. Del mismo modo, la cribado facilita información en cuanto a genes vitales que se requieren para la acción del fármaco. Por ejemplo, para los fármacos contra el cáncer, la cribado identifica los sistemas vitales que están implicados en la eliminación de células tumorales.

5 El procedimiento implica la exposición de una población de células a dos entidades. Las células son expuestas a un fármaco, dado que esta es la entidad objeto de la investigación; esto hace que el procedimiento sea específico para ese fármaco particular. En segundo lugar, las células son expuestas a una genoteca de compuestos que tiene como objetivos varios genes diferentes, modulando los compuestos el nivel o la actividad de una proteína que potencialmente hace falta para la susceptibilidad al fármaco. Como consecuencia del diseño de esta
10 metodología, si se manifiesta un fenotipo diferencial como consecuencia de la exposición de las células al fármaco en comparación con células que han sido expuestas al fármaco pero que no han sido expuestas a los compuestos inhibidores, esto indica que la proteína cuyo nivel o cuya actividad han sido modulados puede estar implicada en el mecanismo de acción del fármaco y, así, identifica a esta proteína como un biomarcador útil.

15 La operación de la metodología puede ejemplificarse con un ejemplo en el que se usa una cribado de interferencia génica de ARNip en todo el genoma para identificar los genes funcionalmente importantes que influyen en la sensibilidad a los inhibidores de la histona deacetilasa (HDAC). Los inhibidores de HDAC son un grupo particularmente relevante de nuevos agentes anticancerígenos. Hay en desarrollo clínico inhibidores de HDAC químicamente diferenciados que incluyen en particular el linfoma periférico de células T, el linfoma cutáneo de
20 células T, la leucemia linfocítica crónica y el cáncer de próstata independiente de andrógenos. Sin embargo, la utilidad clínica (por ejemplo, tumor sensible, fase de la enfermedad, combinación de fármacos relevantes) es, en el momento actual, imposible de predecir. Serían un paso adelante muy importante biomarcadores que informasen sobre los patrones de sensibilidad del tumor, tanto para maximizar el beneficio clínico del fármaco como para diferenciar entre inhibidores de HDAC. Aunque se centra en los inhibidores de HDAC, el ejemplo descrito tiene idéntica aplicación a otras clases de terapias basadas en mecanismos en las que se requiere una ralentización del
25 crecimiento, la diferenciación o la proliferación celulares para tratar con éxito la enfermedad.

En el presente documento, la plataforma de cribado ha sido validada con estudios sobre los inhibidores de HDAC utilizando una genoteca de ARNip que tiene como diana a genes humanos que han sido seleccionados por la
30 asociación con el cáncer y otras enfermedades humanas. Los inhibidores de HDAC matan células tumorales. Las células tumorales tratadas con la genoteca de ARNip y un inhibidor de HDAC apropiado sobreviven debido a la pérdida de un gen que es diana del ARNip. Sobreviven evitando la apoptosis que, si no, habría sido inducida por el inhibidor de HDAC si el gen hubiera estado presente y activo dentro de la célula. Es decir, es preciso que el gen esté expresado para que confiera sensibilidad al inhibidor de HDAC. En consecuencia, esta metodología identifica como
35 biomarcadores a genes que son diana para los inhibidores de HDAC. La Figura 1 representa una ilustración de cómo opera la metodología.

El procedimiento de la invención evalúa la respuesta de una población de células a un fármaco particular identificando biomarcadores de enfermedad. Así, la invención puede ser usada de muchas maneras diferentes para
40 evaluar la idoneidad de una célula particular al tratamiento con un fármaco particular.

Un ejemplo es en la atención clínica durante la diagnosis, por ejemplo, de células tumorales tomadas de un paciente particular. Si se encuentra que estas células tumorales hipotéticas tienen niveles elevados del gen X o de proteína activa codificada por el gen X y la metodología de la invención identifica que el gen X está implicado en la
45 susceptibilidad a un fármaco o a una combinación de fármacos particulares, entonces ese fármaco o esa combinación de fármacos es un buen candidato para la terapia en ese paciente y es probable que el tumor responda mejor al fármaco. En cambio, si el gen X o su proteína codificada solo están presentes en bajos niveles, entonces es improbable que el tumor responda bien a ese fármaco particular.

50 Los efectos cuantitativos de fármacos o combinaciones de fármacos también pueden ser medidos. Por ejemplo, la genoteca de compuestos que inhibe el nivel o la actividad de la proteína de la célula puede ser usada en pruebas separadas para inhibir un gen en grados diferentes y el fenotipo celular puede ser monitorizado en estas pruebas separadas, opcionalmente también bajo condiciones farmacológicas diferentes. Por condiciones farmacológicas diferentes se pretende incluir diferentes concentraciones del fármaco, diferentes tiempos de
55 exposición al fármaco, diferentes combinaciones de fármacos, etcétera. Por supuesto, en este sistema también pueden ensayarse diversas combinaciones de diferentes concentraciones, tiempos de exposición y combinaciones de fármacos.

En el entorno clínico, también será muy interesante explorar la regulación temporal de los biomarcadores durante el avance de la enfermedad, dado que la eficacia de los fármacos y las combinaciones de fármacos varía en las diversas fases del avance de la enfermedad. En la actualidad hay muy pocos procedimientos con los que puede ser evaluada tal variación. La invención permite la evaluación de efectos temporales de cara al diseño de
60 tratamientos que no solo están diseñados a medida de cada paciente, sino también a la de la fase particular de la enfermedad.

65

La divulgación también permite la evaluación del grado en que enfermedades particulares como los tumores son susceptibles a la mutación. La expresión en tejido normal y cualquier influencia polimórfica dentro de la población de pacientes también serán susceptibles de estudio usando este instrumento.

5 También es posible desconvolucionar el mecanismo del tratamiento con un fármaco. Por ejemplo, es posible evaluar qué impacto tiene el tratamiento con el fármaco en el nivel de expresión.

10 Otra aplicación permite que las empresas farmacéuticas coloquen sus fármacos y compuestos de partida de manera más efectiva. Los fármacos que, durante su desarrollo, son prometedores para el tratamiento de una enfermedad particular lo son generalmente por un mecanismo de acción percibido que puede ser entendido solo en parte. El procedimiento de la invención permite la disección de un mecanismo de acción de un fármaco, de modo que su pleno potencial pueda ser apreciado más fácilmente. Esto es posible debido a la facilidad para demostrar diferencias en eficacia entre diferentes subgrupos de pacientes (por ejemplo, por criterios de género o de raza), diferentes fases de la enfermedad, diferentes polimorfismos de genes (por ejemplo, P450 o receptor Fc), etcétera.

15 Ocurre a menudo que varias empresas farmacéuticas tienen compuestos en desarrollo clínico para la misma diana. La invención permite que una empresa ponga su fármaco en relación con otros, ya sea para una enfermedad particular, una fase de una enfermedad o un grupo de pacientes. Esto ayudará a una empresa a diferenciar la eficacia de su propio fármaco, en demostrar el valor a los organismos autorizadores de fármacos, que, en la actualidad, se encuentran en un estado de alerta intensificada de seguridad y promoviendo nuevos paradigmas de tratamiento en un momento de gran escepticismo ante los motivos de las empresas farmacéuticas y una creciente sensibilidad antes los costes entre los contribuyentes.

20 Una aplicación relacionada de la invención estará en encontrar aplicaciones nuevas, seguras y efectivas de fármacos que han presentado efectos secundarios adversos o que se han mostrado ineficaces en el tratamiento de afecciones para las que se recetaron en origen.

25 Se proporciona un ejemplo en la clase de inhibidores de CDK, que muestran una prometedora eficacia antitumoral *in vitro*, pero que, hasta la fecha, no se ha demostrado que sean efectivos *in vivo*. Esto se debe probablemente a que los investigadores no hayan explorado aún su mecanismo de acción precisamente lo suficiente como para adaptar su uso a un entorno clínico. El procedimiento de la invención permitirá que se investigue este mecanismo de acción preciso.

30 Hay también numerosos ejemplos de fármacos que han sido retirados del mercado. Un ejemplo es la retirada mundial voluntaria por parte de Merck del Vioxx (rofecoxib), fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) selectivo COX-2 usado para aliviar los signos y los síntomas de la artritis, el dolor agudo y los ciclos menstruales dolorosos, debido a la evidencia de que el fármaco puede provocar un riesgo aumentado de episodios cardiovasculares, como ataques cardíacos y apoplejías, durante su uso crónico. Es muy probable que sí existan terapias seguras y efectivas para el Vioxx, pero hay muy pocos procedimientos existentes mediante los cuales puedan ser identificadas tales terapias. En cambio, la invención permite tal enfoque.

35 Otra aplicación para la cribado de la invención estará en la identificación de tejidos o hasta de pacientes que es probable que sufran efectos tóxicos por la administración de un fármaco. Por ejemplo, si se expresa un gen particular, identificado como necesario para la susceptibilidad a un fármaco, a nivel elevado en un tejido normal no enfermo, este tejido puede ser identificado como sensible al fármaco. Puede usarse esta información para limitar la toxicidad en tejidos sanos. Esto se ve comúnmente en muchos fármacos, particularmente en fármacos anticancerosos.

40 Los biomarcadores que predicen la sensibilidad de la enfermedad, aunque importantes en el entorno clínico, podrían tener también implicaciones importantes para comprender el mecanismo de acción de nuevos fármacos. Usando de nuevo el campo del cáncer como ejemplo, se conocen inhibidores de HDAC que son agentes apoptóticos profundos. Sin embargo, de forma mecanicista, no está clara la identidad de dianas cruciales corriente abajo que median en el resultado apoptótico. Los biomarcadores identificados usando el procedimiento de la invención proporcionarán claves mecanicistas importantes en la explicación de cómo las células tumorales entran en la apoptosis.

45 El procedimiento de la invención implica la exposición de la de célula a i) el fármaco candidato; ii) un compuesto que modula el nivel o la actividad de una proteína que potencialmente hace falta para la susceptibilidad al fármaco.

50 El fármaco candidato puede ser cualquier fármaco. Ejemplos incluyen fármacos propuestos para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares, trastornos autoinmunes/inflamatorios, trastornos cardiovasculares, trastornos neurológicos y psiquiátricos, trastornos del desarrollo, trastornos genéticos, trastornos metabólicos, infecciones y otras condiciones patológicas. De relevancia particular son las enfermedades en las que la proliferación celular aberrante desempeña un papel y que incluyen cáncer, neoplasia, tumor cerebral, glioma, tumor

óseo, tumor pulmonar, tumor de mama, tumor de próstata, tumor de colon, hemangioma, trastorno mieloproliferativo, leucemia, enfermedad hematológica, trastornos de angiogénesis, enfermedad dermatológica, fibrosis, enfermedad cardiovascular y endometriosis. Los expertos en la técnica conocerán ejemplos similares.

5 Un ejemplo de una clase preferente de fármacos para el cual se ha ejemplificado la invención en el presente documento es la clase de los inhibidores de HDAC. Otros ejemplos serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen los inhibidores de aurora quinasa, los inhibidores de cdk, los inhibidores de mTOR y productos naturales como la quercetina y análogos de la misma, particularmente productos naturales para los cuales puede haber múltiples dianas y sistemas.

10 Una combinación de fármacos también puede ser sometida a prueba según la invención. Por ejemplo, se sabe que ciertos fármacos funcionan bien en combinación, ya sea mediante efectos aditivos o sinérgicos. Del mismo modo, muchos fármacos no funcionan bien en combinación, ya sea debido a que sus efectos mecanicistas no son compatibles o porque interactúan entre sí. Todos estos escenarios pueden ser evaluados según la invención probando combinaciones conjuntas de fármacos. Las combinaciones pueden incluir dos, tres, cuatro, cinco, seis o más fármacos distintos. Cuando se aplican en combinación, pueden usarse fármacos con la misma concentración o con concentraciones diferentes. Pueden usarse fármacos a su dosis recomendada o dentro de un intervalo recomendado de dosificación. Alternativamente, pueden usarse fármacos a una concentración menor o mayor que su dosificación recomendada, por ejemplo, para explorar mecanismos potencialmente inexplorados o para investigar el potencial de efectos secundarios de una sobredosis.

15 De acuerdo con el procedimiento de la divulgación, una célula será expuesta al fármaco. Generalmente, se expondrá al fármaco una población de células. Por "expuesta" se quiere decir que la célula es puesta en contacto con el fármaco para que sus efectos puedan manifestarse. Generalmente, la forma más apropiada de exposición implica la incorporación del fármaco al medio en el que se desarrolla la célula, con una concentración adecuada. Por supuesto, el fármaco puede ser aplicado a diferentes poblaciones de células a concentraciones diferentes y, haciéndolo así, puede realizarse una evaluación de la respuesta a la dosis.

20 La célula también se expone a un compuesto que modula el nivel o la actividad de una proteína que potencialmente hace falta para la susceptibilidad al fármaco. Una ventaja del procedimiento de la divulgación es que puede explorarse el mecanismo de acción de un fármaco sin ningún conocimiento existente de su mecanismo de acción ni concepto previo de cómo funciona. En consecuencia, un procedimiento apropiado implica la exposición de una población de células a una genoteca de compuestos, en el que cada compuesto de la genoteca tiene como diana un gen o una proteína que están potencialmente implicados en el mecanismo de acción del fármaco.

25 El compuesto debe modular el nivel o la actividad de una proteína que está potencialmente implicada en el mecanismo de acción de un fármaco particular. El término "modular" incluye la reducción, así como la mejora. La actividad o el nivel de la proteína pueden ser modulado un 10%, 20%, 40%, 80%, 150%, 500%, 1000% o más con respecto a la intensidad de su tipo salvaje. Preferentemente, el compuesto puede reducir, inhibir o "inhabilitar" el nivel de expresión o la actividad de la proteína. Más preferentemente, el compuesto puede reducir, inhibir o "inhabilitar" el nivel de expresión de la proteína. Preferentemente, el compuesto reduce el nivel de expresión en menos de un 50%, 25%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% o menos del nivel de su tipo salvaje.

30 Ejemplos de compuestos de ácidos nucleicos que pueden ser usados según la invención incluyen ARNi, ARNh_c, ARNi_p, ribozimas, ácidos nucleicos antisentido, como el ARN antisentido. En teoría, podrían usarse genotecas de anticuerpos o compuestos de molécula pequeña. Es particularmente preferente el uso de ARNi y de ARNh_c que, en su debido momento, genera moléculas de ARNi_p. El ARNi_p puede ser distribuido usando vectores, particularmente vectores virales, o puede ser introducido directamente en las células como ARNi_p sintético. Un problema del uso de una introducción directa de ARNi_p sintético es la corta vida media, que vuelve deficientes los efectos a la larga en la expresión de los genes. Sin embargo, es probable que los avances en la tecnología del ARNi_p mejoren significativamente la vida media en los años venideros.

35 Por ejemplo, las células pueden ser expuestas a una genoteca de vectores de ARNi_p que se incorporen dentro de las células. La multiplicidad de la infección puede ser organizada de tal modo que, como media, cada célula incorpore un solo vector y este vector exprese una especie de ARNi_p que interfiera la expresión de un gen particular. En consecuencia, en cada célula, la expresión de un gen sufre una interferencia, permitiendo así que los efectos del fármaco sean evaluados en ausencia de ese gen. Si la célula sobrevive pese a la presencia del fármaco, puede inferirse que el gen hace falta para la sensibilidad al fármaco. En consecuencia, las células en las que ese gen particular está sobreexpresado representan buenas candidatas para un tratamiento efectivo con el fármaco.

40 Preferentemente, según la invención, se usa una genoteca de interferencia a ARN vectorizado. Esta puede ser una genoteca de interferencia a ARN viral vectorizado, por ejemplo, usando lentivirus, adenovirus (Galapagos, Bélgica), virus de viruela, etcétera (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, 2005, J. RNAi and Gene Silencing, 1(1); 5-11). Las genotecas de base viral (incluyendo las genotecas retrovirales) funcionan bien porque dan como resultado la distribución eficiente de ácido nucleico a las células. Los niveles de expresión pueden ser inferiores, por ejemplo,

porque los retrovirus se integran en el ADN y, por ello, se ven influidos por el entorno de cromatina, aunque vuelve a preverse que mejoras en los años venideros reduzcan este problema.

5 Por supuesto, como apreciará el experto, son posibles variaciones sobre la idea del uso de genotecas. Por ejemplo, en el caso de genotecas de ARNip, se puede variar la multiplicidad de la infección, por ejemplo, entre menos de 1 y más de 100 para garantizar que la interferencia génica ocurre de manera eficiente. Además, pueden usarse compuestos diferentes (por ejemplo, ARNip) que tengan como diana partes diferentes de una selección de genes (por ejemplo, 10, 100, 1000, 10000), o incluso partes diferentes de un solo gen. Por ejemplo, podrían usarse compuestos (por ejemplo, ARNip) contra partes diferentes de un solo gen para explorar los efectos diferenciales de variantes de corte y empalme.

10 También sería posible hacer condicional el efecto de los compuestos inhibidores, por ejemplo, usando promotores inducibles, de modo que se hace que la expresión de un compuesto (por ejemplo, ARNip) sea condicional a la presencia de un agente inductor particular, que puede ser administrado cuando se requiera.

15 Preferentemente, una genoteca de compuestos usada según se ha descrito en lo que antecede toma como diana un número de genes diferentes, por ejemplo mayor de 100, mayor de 1000, mayor de 10.000, mayor de 15.000, mayor de 20.000, mayor de 25.000, mayor de 30.000, mayor de 35.000 o más. Los genes convertidos en diana de los compuestos de la genoteca pueden estar en todo el genoma (Qiagen, Hilden, Alemania, fabrica ejemplos; también Dharmacon, Lafayette, EE. UU.). También se han construido recientemente genotecas a gran escala por investigadores académicos (Paddison *et al.*, 2004, Nature 428; 427-431; Berns *et al.*, 2004, Nature, 428; 431-437; Michiels *et al.*, 2002, Nat. Biotechnol. 201154-1157) y comercialmente (Galapagos, Bélgica; Genordia AB, Suecia). Los genes convertidos en diana de los compuestos de la genoteca pueden ser específicos a una enfermedad particular (por ejemplo, cáncer, enfermedad neurodegenerativa, trastornos inflamatorios).

20 El cribado que ha sido ejemplificada en el presente documento utiliza una genoteca de ARNip que tomo como diana aproximadamente 13.000 genes humanos que han sido seleccionados por la asociación con el cáncer y otras enfermedades humanas. Las células tratadas con la genoteca de ARNip y un fármaco apropiado sobreviven debido a la pérdida de un gen que es tomado como diana por el ARNip. Sobreviven evitando la apoptosis que, si no, habría sido inducida por el inhibidor de HDAC si el gen hubiese estado presente y activo dentro de la célula.

25 Los resultados de la metodología se evalúan buscando un fenotipo en la célula. Preferentemente, el fenotipo de la célula se mide por comparación con células de control. Adecuadamente, las células de control han sido tratadas con el fármaco candidato, pero no han sido expuestas al compuesto que modula el nivel o la actividad de la proteína que potencialmente hace falta para la susceptibilidad al fármaco. De esta manera, cualquier fenotipo que se observe puede ser ligado específicamente a los efectos del compuesto.

30 Cualquier diferencia fenotípica entre las células tratadas y las células de control resulta potencialmente de interés. Un fenotipo puede estar relacionado con la función general o el aspecto de la célula, o puede ser un fenotipo molecular, tal como un aumento o una disminución en el nivel o la actividad de una proteína particular. En este sentido, puede realizarse un ensayo para detectar un fenotipo específico usando técnicas moleculares como RT-PCR, inmunohistoquímica, transferencia de Western, transferencia de ADN, etcétera.

35 El fenotipo observado puede ser las características de supervivencia o de crecimiento de la célula. Por ejemplo, en la ilustración de la invención que se describe más arriba usando vectores de ARNip para inhabilitar la expresión de un gen particular, la supervivencia es indicativa de la inhabilitación de un gen que hace falta para la susceptibilidad al fármaco. La supervivencia puede medirse de varias maneras diferentes, como entenderá el experto. Ejemplos incluyen ensayos de viabilidad y supervivencia celulares, que son bien conocidos en la técnica. En los ejemplos usados en el presente documento, la supervivencia celular se monitorizó buscando la aparición de colonias sobre placas tratadas conjuntamente con fármaco y la genoteca viral de codificación de ARNip.

40 Diversos genes han estado implicados en la susceptibilidad de las células a los inhibidores de HDAC. Estos descubrimientos permiten varios desarrollos. Por ejemplo, los tumores pueden ser estratificados en agrupaciones que es probable que experimenten respuestas más favorables a los inhibidores de HDAC. Pueden efectuarse evaluaciones específicas del perfil de expresión de un paciente para uno o más de estos genes y, en base a estas evaluaciones, puede formularse una diagnosis de si el paciente es un candidato adecuado para el tratamiento con un inhibidor de HDAC. Si lo es, puede realizarse entonces una evaluación más detallada en cuanto a la forma óptima que debería adoptar el tratamiento (por ejemplo, dosificación, tiempo y procedimiento de administración, combinación de fármacos).

45 También es probable que las selecciones del tipo descrito en el presente documento identifiquen dianas terapéuticas conocidas como las enzimas como determinantes de la sensibilidad al fármaco. Por lo tanto, información como esta predecirá combinaciones probables de fármacos que serán efectivos en la atención clínica. Por ejemplo, en el contexto de los inhibidores de HDAC, puede ser que tales inhibidores puedan ser usados para tratar tumores en conjunción con un fármaco contra una diana terapéutica identificada en la cribado.

Estos descubrimientos también suponen un avance para nuestra comprensión mecanicista del procedimiento de acción de los inhibidores de HDAC. En el presente documento han sido identificados los sistemas reguladores vitales afectados por los inhibidores de HDAC y necesarios para el resultado apoptótico. Los inventores presentan la hipótesis de que las propias proteínas identificadas por medio de la cribado de interferencia génica puedan ser modificadas por acetilación o, alternativamente, puedan interactuar con otras proteínas sometidas a control de acetilación, permitiéndoles que sean modificadas y funcionen en sistemas requeridos para la apoptosis. Dilucidar el papel de estas novedosas proteínas efectoras identificará los sistemas esenciales que son diana de los inhibidores de HDAC y necesarios para la inducción de apoptosis.

Por ejemplo, estos descubrimientos permiten el desarrollo de regulares, como moléculas pequeñas de fármaco, que afectan a la actividad de las proteínas codificadas por estos genes, permitiendo así que se refinan enfermedades y afecciones fisiológicas que son tratables usando inhibidores de HDAC. Por ejemplo, tales moléculas reguladoras pueden afectar al estado de acetilación de estas proteínas o pueden afectar su capacidad de interactuar con otras proteínas que son sometidas a acetilación por los inhibidores de HDAC.

Los genes identificados en el presente documento con gran confianza como esenciales para la susceptibilidad a la acción de los inhibidores de HDAC incluyen los enumerados en el presente documento en la Figura 2. Estos genes son hHRAD23B (NM_002874; rad humano 23B); RFC1 (NM_002913; factor de replicación C1); MYD88 (NM_002468; gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mielóide); PTBP1 (NM_002819; proteína 1 de enlace de tracto de polipirimidina); PPP4R1 (NM_005314; subunidad 1 reguladora de la proteína fosfatasa 4); LIF (NM_002309; factor inhibidor de la leucemia); LIFR (NM_002310; receptor del factor inhibidor de la leucemia). Otros genes identificados incluyen SCBGB2A2 (NM_902411; secretoglobina, familia 2A, miembro 2); HLA-DQB1 (NM_002123; complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DQ beta 1); PVRL1 (NM_002855; receptor atípico 1 de poliovirus); SERPA10 (NM_016186; serpina A10); HEXB (NM_000521; hexosaminidasa B); PPAT (NM_002703; fosforibosilpirofosfato amidotransferasa); LDHB (NM_002300; lactato dehidrogenasa B); MAN2A1 (NM_002372; miembro 1 de la manosidasa 2A); PLECK2 (NM_016445; pleckstrina 2); y SART2 (NM_013352; antígeno del carcinoma de células escamosas reconocido por células T).

Estos descubrimientos permiten el desarrollo de agentes y procedimientos diagnósticos que son adecuados para evaluar a un paciente particular o a una muestra de pacientes en cuanto a su susceptibilidad al tratamiento con un inhibidor de HDAC, de modo que los tumores puedan ser estratificados en agrupaciones que es probable que experimenten respuestas más favorables a los inhibidores de HDAC. También allanan el camino para la identificación de mutaciones y polimorfismos (como los SNP) dentro de genes que codifican estas proteínas, permitiendo así la evaluación del potencial de tratamiento de un paciente individual usando un inhibidor de HDAC.

Este aspecto de la invención proporciona un procedimiento de diagnóstico de la susceptibilidad de un individuo que padece una enfermedad al tratamiento con un inhibidor de HDAC, comprendiendo el procedimiento la evaluación de la expresión o actividad de un gen o sus productos de expresión, o la secuencia de un gen, en una muestra de un paciente y comparando dicho nivel de expresión o actividad o secuencia con una referencia, en donde un nivel de expresión o actividad o secuencia que es diferente de dicha referencia es indicativo de una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC en relación con el estado de referencia, y en donde dicho gen es hHRAD23B (rad 23B humano).

La divulgación también proporciona un procedimiento de diagnóstico de la susceptibilidad de un individuo que padece una enfermedad al tratamiento con un inhibidor de HDAC, comprendiendo el procedimiento evaluar la secuencia o el nivel de la expresión o la actividad de uno cualquiera de los genes del grupo de hHRAD23B, RFC1, MYD88, PTBP1, PPP4R1, LIF, LIFR, SCBGB2A2, HLA-DQB1, PVRL1, SERPA10, HEXB, PPAT, LDHB, MAN2A1, PLECK2 y SART2, o sus productos de expresión, en tejido de dicho paciente y la comparación de dicha secuencia, nivel de expresión o actividad con una referencia, en la cual una secuencia, nivel de expresión o actividad que sea diferente de dicha referencia es indicativa de una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC con respecto al estado de referencia. Generalmente, un nivel que sea significativamente mayor que el nivel de referencia indicará que el individuo es más susceptible al tratamiento con el inhibidor de HDAC. Un nivel que sea significativamente menor que el nivel de referencia es indicativo de la resistencia potencial de un individuo al tratamiento con el inhibidor de HDAC. Por "significativo" se quiere decir que el nivel de expresión o actividad es más del 10%, 25%, 50%, 100%, 250%, 500%, 1000%, o más, inferior al nivel de referencia.

El producto de expresión es, preferentemente, una proteína, aunque, alternativamente, pueden detectarse productos de expresión de ARNm. Si se usa una proteína, la proteína puede ser detectada por un anticuerpo que, preferentemente, se enlace específicamente con esa proteína. La expresión "se enlace específicamente" quiere decir que los anticuerpos tienen una afinidad por su polipéptido diana sustancialmente mayor que su afinidad por otros polipéptidos relacionados y que, preferentemente, no interaccionan con otras proteínas. Según se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas intactas, así como a fragmentos de las mismas, como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de enlazarse con el determinante antigénico en cuestión. Con "afinidad sustancialmente mayor" se quiere decir que hay un aumento medible en la afinidad por el polipéptido diana de la

invención en comparación con la afinidad por otros polipéptidos relacionados. Preferentemente, la afinidad es al menos 1,5, 2, 5, 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 veces o mayor por el polipéptido diana. Preferentemente, los anticuerpos se enlazan con la proteína detectada con afinidad elevada, preferentemente con una constante de disociación de 10^{-4} M o menos, preferentemente de 10^{-7} M o menos, y lo más preferente es que sea de 10^{-9} M o menos; se prefiere una afinidad subnanomolar (0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 nM o incluso menos).

Por ejemplo, el procedimiento puede comprender las etapas de: (a) poner en contacto un ligando de hHRAD23B, como un anticuerpo contra hHRAD23B, con una muestra biológica en condiciones adecuadas para la formación de un complejo ligando-proteína; y (b) detectar dicho complejo.

Cuando se usa un producto de expresión de ARNm, es detectado, preferentemente, por medio de las etapas de poner en contacto una muestra de tejido con una sonda bajo estrictas condiciones que permiten la formación de un complejo híbrido entre el ARNm y la sonda; y de detectar la formación de un complejo. Los procedimientos preferentes incluyen la comparación de la cantidad de complejo formado con el formado cuando se usa un tejido de control, indicando una diferencia en la cantidad de complejo formado entre el control y la muestra la presencia de cáncer. Preferentemente, la diferencia entre la cantidad de complejo formado por el tejido de prueba con respecto al tejido normal es un aumento o una disminución. Más preferentemente, se considera significativa una diferencia del doble en la cantidad de complejo formado. Aún más preferentemente, son significativos un aumento o un descenso de 3, 4, 5, 10, 20, 50 o incluso 100 veces en la cantidad de complejo formado.

En esta metodología alternativa, el procedimiento puede comprender las etapas de: a) poner en contacto una muestra de tejido del paciente con una sonda de ácido nucleico bajo condiciones estrictas que permiten la formación de un complejo híbrido entre una molécula de ácido nucleico que codifique hHRAD23B y la sonda; b) poner en contacto una muestra de referencia con la sonda bajo las mismas condiciones usadas en la etapa a); y c) detectar la presencia de complejos híbridos en dichas muestras; siendo indicativa la detección de niveles del complejo híbrido en la muestra del paciente que difieren de los niveles del complejo híbrido en la muestra de referencia de una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC con respecto al estado de referencia de la enfermedad.

El procedimiento puede comprender las etapas de: a) poner en contacto una muestra de ácido nucleico del tejido de un paciente con un cebador de ácido nucleico bajo condiciones estrictas que permiten la formación de un complejo híbrido entre una molécula de ácido nucleico que codifica hHRAD23B y el cebador; b) poner en contacto una muestra de referencia con el cebador bajo las mismas condiciones usadas en la etapa a); c) amplificar el ácido nucleico muestreado; y d) detectar el nivel del ácido nucleico amplificado tanto del paciente como de las muestras de referencia; siendo indicativa la detección de niveles del ácido nucleico amplificado en la muestra del paciente que difieran significativamente de los niveles del ácido nucleico amplificado en la muestra de referencia de una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC con respecto al estado de referencia.

El procedimiento puede comprender las etapas de: a) obtener una muestra de tejido de un paciente sometido a una prueba de detección de la enfermedad; b) aislar de la muestra de tejido una molécula de ácido nucleico que codifica hHRAD23B; y c) diagnosticar al paciente detectando la presencia de una mutación que está asociada con una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC. Este procedimiento puede comprender, además, amplificar la molécula de ácido nucleico para formar un producto amplificado y detectar la presencia o la ausencia de una mutación en el producto amplificado. La presencia o la ausencia de la mutación en el paciente puede ser detectada poniendo en contacto la molécula de ácido nucleico con una sonda de ácido nucleico que se hibride con la molécula de ácido nucleico bajo condiciones estrictas para formar una molécula híbrida bicatenaria, teniendo la molécula híbrida bicatenaria una porción no hibridada de la hebra de la sonda de ácido nucleico en cualquier porción correspondiente a una mutación asociada con el perfil de susceptibilidad; y detectar la presencia o la ausencia de una porción no hibridada de la hebra de sonda como indicación de la presencia o la ausencia de una mutación asociada con la susceptibilidad.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico, que:

i) comprende una secuencia enumerada en cualquiera de los números de entrada NM_002874.3; NM_002913; NM_002468; NM_002819; NM_005314; NM_002309; NM_002310; NM_002411; NM_002123; NM_002855; NM_016186; NM_000521; NM_002703; NM_002300; NM_002372; NM_016445; y NM_013352;

ii) es un fragmento de una secuencia de acuerdo con i);

iii) comprende el complemento de i) o ii);

iv) hibrida bajo condiciones de rigurosidad altas una molécula de ácido nucleico de acuerdo con i) o ii); para su uso en el diagnóstico o terapia de una enfermedad proliferativa como cáncer o una enfermedad o trastorno que implica un cambio en la diferenciación celular o tasa de crecimiento.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona una proteína, dicha proteína:

5 i) tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos enumerada por cualquiera de los números de entrada NM_002874.3; NM_002913; NM_002468; NM_002819; NM_005314; NM_002309; NM_002310; NM_002411; NM_002123; NM_002855; NM_016186; NM_000521; NM_002703; NM_002300; NM_002372; NM_016445 y NM_013352;

10 ii) es un fragmento de una proteína de acuerdo con i), siempre que dicho fragmento retenga una actividad biológica poseída por el polipéptido de longitud completa de i) o ii), o tenga un determinante antigénico en común con el polipéptido de i) o ii);

15 para su uso en el diagnóstico o terapia de una enfermedad proliferativa como cáncer o una enfermedad o trastorno que implica un cambio en la diferenciación celular o tasa de crecimiento.

20 La divulgación también incluye ligandos, como los anticuerpos, que se enlazan específicamente y que, preferentemente, inhiben la actividad de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos enumerada en uno cualquiera de los números de registro NM_002874; NM_002913; NM_002468; NM_002819; NM_005314; NM_002309; NM_002310; NM_002411; NM_002123; NM_002855; NM_016186; NM_000521; NM_002703; NM_002300; NM_002372; NM_016445; y NM_013352. Tales ligandos pueden ser usados en la fabricación de un medicamento para la diagnosis o la terapia de una enfermedad proliferativa, como el cáncer, o de una enfermedad o una afección que implique un cambio en la diferenciación o en la tasa de crecimiento celulares.

25 La muestra biológica usada en los procedimientos de la invención es, preferentemente, una muestra de tejido. Puede usarse cualquier muestra de tejido, como sangre, orina, saliva o una biopsia de un tejido específico. Preferentemente, las células son aisladas usando procedimientos no invasivos; por ejemplo, aislando células tumorales en circulación para proporcionar el material necesario para la medición de biomarcadores.

30 La divulgación también proporciona un procedimiento de tratar una enfermedad en un paciente con necesidad de dicho tratamiento administrando a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, una molécula de ácido nucleico o ligando como se describe con anterioridad. Dicha composición puede administrarse en la forma de una composición farmacéutica. Dicha composición incluirá el compuesto en conjunción con un portador farmacéuticamente aceptable. Dicho compuesto puede administrarse en conjunción con un inhibidor de HDAC, por ejemplo, por administración separada, simultanea o secuencial.

35 La divulgación también proporciona un procedimiento para monitorizar el tratamiento terapéutico de una enfermedad o afección fisiológica en un paciente, que comprende monitorizar durante un periodo de tiempo el nivel de expresión o actividad de una proteína, molécula de ácido nucleico o ligando de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos anteriormente de la divulgación en un tejido de dicho paciente, en donde alterar dicho nivel de expresión o actividad durante el periodo de tiempo hacia un nivel de control es indicativo de regresión de dicha enfermedad o afección fisiológica. El nivel de expresión o actividad de un gen o su proteína codificada en un primer momento temporal puede compararse con la expresión del mismo producto de la expresión en un segundo momento temporal, en donde un cambio en la expresión o actividad en el segundo momento temporal en relación al primer momento temporal puede correlacionarse con la regresión o progresión de una enfermedad en el que está implicado el gen.

40 Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o afección proliferativa (como se describe con anterioridad) que implica un cambio en la diferenciación celular o tasa de crecimiento modulando el estado de acetilación de cualquiera de las proteínas codificadas por hHRAD23B, RFC1, MYD88, PTBP1, PPP4R1, LIF, LIFR, SCBGB2A2, HLA-DQB1, PVRL1, SERPA10, HEXB, PPAT, LDHB, MAN2A1, PLECK2 y SART2. Dicho procedimiento puede modular el estado de acetilación de más de una de estas proteínas, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o las 9. Preferiblemente, el estado de acetilación de estas proteínas se reduce de acuerdo con la divulgación.

45 Los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser realizados *in vitro*.

50 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para la identificación de un compuesto que es eficaz en el tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad proliferativa como el cáncer o una enfermedad o afección que implica un cambio en la diferenciación celular o tasa de crecimiento, que comprende poner en contacto una proteína, molécula de ácido nucleico, o ligando de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos anteriormente de la divulgación con uno o más compuestos sospechosos de poseer afinidad de enlace para dicha proteína, molécula de ácido nucleico, o ligando, y seleccionar un compuesto que enlaza específicamente con dicha molécula de ácido nucleico, proteína o ligando.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un kit útil para diagnosticar a un paciente, particularmente para evaluar la idoneidad para tratamiento de HDAC, que comprende un primer contenedor que contiene una sonda de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación descritos anteriormente; un segundo contenedor contiene cebadores útiles para amplificar dicha molécula de ácido nucleico; e instrucciones para usar la sonda y los cebadores para facilitar el diagnóstico. El kit puede comprender adicionalmente un tercer contenedor para mantener un agente para digerir ARN no hibridado.

Para facilitar el diagnóstico usando uno de los métodos indicados anteriormente, en un aspecto adicional, la divulgación proporciona una matriz de al menos dos moléculas de ácidos nucleicos, en donde cada una de dichas moléculas de ácidos nucleicos o se corresponde con la secuencia de, es complementaria a la secuencia de, o hibrida específicamente con una molécula de ácido de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación descritos con anterioridad. Dicha matriz puede contener moléculas de ácidos nucleicos que o se corresponden con la secuencia de, son complementarias a la secuencia de, o hibridan específicamente con al menos 1-9 o más de las moléculas de ácidos nucleicos como se enumeran anteriormente. Las moléculas de ácidos nucleicos en la matriz pueden consistir de oligonucleótidos de entre doce y cincuenta nucleótidos, más preferiblemente, entre cuarenta y cincuenta nucleótidos. Alternativamente, las moléculas de ácidos nucleicos en la matriz pueden consistir de insertos de ADNc amplificados por PCR donde la molécula de ácido nucleico es de entre 300-2000 nucleótidos.

En un aspecto relacionado, de nuevo útil para el diagnóstico, la divulgación proporciona una matriz de anticuerpos, que comprende al menos dos especies de anticuerpos diferentes, en donde cada especie de anticuerpo es inmunoespecífica con una proteína como se describe con anterioridad. La divulgación también proporciona una matriz de proteínas, que comprende al menos dos especies de proteínas como se enumeran con anterioridad. Los kits útiles en los métodos de diagnóstico de la divulgación comprende dicha matriz de ácidos nucleicos, anticuerpos y/o proteínas.

Un kit puede comprender también uno o más anticuerpos que enlazan con una proteína como se ha enumerado anteriormente, y un reactivo útil para la detección de una reacción de enlace entre el anticuerpo y la proteína.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un animal no humano genéticamente modificado que se ha transformado para expresar niveles más altos, más bajos o ausentes de una proteína de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación descritos con anterioridad. Preferiblemente, dicho animal genéticamente modificado es un animal transgénico o knockout. Más preferiblemente, el animal genéticamente modificado es un roedor, como un ratón.

La divulgación también proporciona un método para cribar un compuesto eficaz para tratar una condición de enfermedad, poniendo en contacto un animal genéticamente modificado no humano como se ha descrito con anterioridad con un compuesto candidato y determinando el efecto del compuesto en el estado fisiológico del animal.

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante e inmunología, que están dentro del dominio de los que trabajan en la técnica.

La mayor parte de las técnicas de biología molecular general, tecnología de ADN recombinante e inmunológicas puede encontrarse en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2001) Cold Harbor-Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, o en Ausubel *et al.*, Current protocols in molecular biology (1990) John Wiley and Sons, Nueva York.

A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con un dominio normal de la técnica a la que pertenece la presente invención.

Generalmente, las enfermedades en las que puede ser de interés la susceptibilidad a los inhibidores de HDAC incluyen los trastornos proliferativos celulares, como el cáncer.

Breve descripción de las Figuras

La **Figura 1** muestra un resumen de resultados funcionales de la cribado de interferencia génica.

- a) Esquema de la estrategia de cribado del ARNhc
- b) Colonias aisladas en la cribado funcional.

La **Figura 2** muestra genes identificados en la cribado de inhibidores de HDAC de interferencia génica. (a) La amplificación por PCR de insertos pRetroSuper procedentes de ADN genómico de colonias aisladas y la

búsqueda por BLASTn de la secuencia resultante permitieron la identificación de genes objeto de interferencia génica en colonias resistentes al SAHA. Estos genes fueron entonces priorizados según la probabilidad de su implicación en el ciclo celular según la información de búsquedas en bases de datos bibliográficas. (b) Función principal, localización y proteínas asociadas del grupo de probabilidad elevada de los genes con sensibilidad al SAHA.

La **Figura 3** muestra el efecto del ARNhc procedente de pRetroSuper sobre los genes diana. Análisis de transferencia de Western de extractos celulares de cribado procedentes de células expandidas de colonias supervivientes únicas para determinar la interferencia en los genes en el grupo de prioridad elevada por medio de la presencia del inserto de ARNhc.

La **Figura 4** muestra una comparación de una interferencia génica estable en contraposición con una transitoria. (a) Dos vectores de interferencia contra hHR23B (HI y HII) junto con un ARNip de horquillado corto que contiene la secuencia del inserto de pRetroSuper fueron transfectados transitoriamente a células U2OS durante 48 o 72 horas para determinar si podían producirse niveles similares de interferencia génica en comparación con el ARNip de control. (b) Se produjeron dos vectores de interferencia génica contra RFC-1 (A y B), junto con un ARNip de horquillado corto que contiene la secuencia del inserto de pRetroSuper que fueron transfectados transitoriamente a células U2OS durante 48 horas. Se compararon entonces los niveles con los niveles de interferencia génica observados en las células aisladas de la cribado. Se usó PCNA como control de carga. NS = pRetroSuper inespecífico, pRS = pRetroSuper.

La **Figura 5** muestra el efecto del RFC1 de ARNip sintético en la sensibilidad al inhibidor de HDAC. a) Se trataron células U2OS con RFC de ARNip seguido por SAHA (tal como se ha descrito) y se midió el nivel de las células sub-G1 (apoptóticas). Los datos representan el cambio porcentual en la fracción sub-G1, en el cual la lámina de ARNip del tratamiento de control se fijó al 100%. b) Las células U2OS tratadas según se indica fueron inmunotransferidas con anti RFC1 o antilámina A/C.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Cultivo y transfección celulares

Se cultivaron células en DMEM (MCF7, U2OS y SAOS2) o RPMI-40 (A2780) que contenían un 10% de FCS y un 1% de penicilina/estreptomycin (Gibco). Las células U2OS fueron transfectadas con ARNip sintético de horquillado corto (Dharmacon), según se indica, usando oligofectamina (Invitrogen) hasta una concentración final de 100 nM antes de la cosecha.

Análisis por FACS

Las células se fijaron en etanol/PBS al 50% durante la noche a 4°C y se incubaron durante 30 min con 1x RNasa A y 20 ng/ml de yoduro de propidio. Las muestras fueron introducidas en un citómetro de flujo FACScan (BD Bioscience) y fueron analizadas usando el soporte lógico CellQuestPro.

Cribado de interferencia génica de ARNi pRetroSuper

Fueron infectadas células U2OS que expresaban el receptor ectrópico murino (U2OSEcR) con la genoteca de ARNi pRetroSuper (Brummelkamp *et al.*, 2002a/b). Cada grupo de la genoteca contenía 100 ARNip por pocillo. Se permitió que las células se recuperaran hasta 72 horas para permitir la expresión y la interferencia génica del ARNip y luego fueron dejadas sobre placas durante la noche (40.000 células por placa). Se añadieron entonces 2 µl de SAHA a cada placa (el número de células y la concentración de SAHA fueron determinados antes de la cribado). Los medios que contenían SAHA fueron sustituidos después cada 3 días durante 18-30 días hasta la aparición de colonias sobre las placas tratadas conjuntamente con SAHA y la genoteca viral. Después, se escogieron y se expandieron colonias para permitir el aislamiento del ADN genómico total y de la proteína total (Figura 1).

Aislamiento de ADN, PCR e identificación de genes

El ADN genómico fue aislado de las células de la colonia usando tampón de lisis (100mM Tris pH 8,5, 0,2% SDS, 200 mM NaCl y 100 µg/ml de proteinasa K) y dejado a 37°C durante 30 minutos con agitación para permitir que el ADN se precipite. A continuación se añadió un volumen de isopropanol al lisato y el precipitado de ADN se disolvió en 10 mM Tris pH 7,5, permitiéndole ser usado en la PCR para determinar la identidad del gen en cuestión. La PCR se llevó a cabo usando el sistema de PCR con cebadores largos de gran expansión (Roche). El inserto genómico fue recuperado usando los cebadores pRS directo: 5'- CCCTTGGAACCTCCTCGTTGACC-3' y pRS inverso: 5'- CAGACGTGCTACTTCCATTTGTC-3'. Cada PCR fue analizada en gel de 1xTBE/agarosa al 1,2%. A continuación, el producto de PCR fue secuenciado (Lark Technologies) para permitir que el gen de interés fuera

identificado.

Inmunotransferencia

5 Las células fueron lavadas con PBS y se lisaron en tampón de lisis TNN (50 mM Tris pH 8, 120 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1mM ditiotreitól e inhibidores de proteasa) a 4°C durante 20 min. Los extractos fueron centrifugados a 16.000 g durante 10 min para eliminar los restos celulares. El lisato celular fue normalizado (ensayo de Bradford) y se confirmó con tinción Ponceau S. La proteína total fue resuelta por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con SDS desnaturalizante antes de la electrotransferencia una membrana Protran de nitrocelulosa y sondeada subsiguientemente con anticuerpo. Los anticuerpos usados fueron RFC-1, MYD88, LIF, LIFR y RNPnh I (Santa Cruz Biotechnology), y hHR23B (Biomol). Se usó quimioluminiscencia mejorada (Pierce) para visualizar el enlace de anticuerpos.

1. Una cribado de interferencia génica funcional para genes de sensibilidad a fármacos

15 La cribado de interferencia génica de ARNhc (Brummelkamp *et al.*, 2002a) implica el uso de una genoteca de ARNhc (en pRetroSuper) que tiene como diana más de 8.000 genes humanos y contiene tres vectores de expresión de ARNhc para cada gen. El ARNip producido a partir del ARNhc induce una supresión intensa y específica de la expresión del gen (Brummelkamp *et al.*, 2002a, b), y la expresión estable de ARNip usando pRetroSuper media la supresión de la expresión del gen en periodos de tiempo prolongados. Esto permite el análisis de fenotipos de pérdida de función en ensayos a largo plazo.

25 Los inventores refinaron la cribado para permitir la identificación de genes necesarios para la apoptosis inducida por inhibidores de HDAC. La base de la cribado es que la interferencia de genes requerida para la apoptosis inducida por inhibidores de HDAC permitiría que la células proliferasen y se desarrollasen en presencia del inhibidor de HDAC (Figura 1). Estas células pueden entonces ser aisladas, puede determinarse la identidad de los genes objeto de interferencia y, después, puede validarse el papel de los genes en ensayos funcionales. De 132 colonias, aproximadamente 25 produjeron una secuencia de ADN que permitió determinar la identidad de los genes diana (esto puede ser consecuencia de que las células sean infectadas con más de un constructo de ARNhc viral). Los genes de los que hace diana el ARNip (Figura 2a) fueron divididos arbitrariamente en tres grupos basados en la probabilidad de que estuvieran implicados en sistemas implicados en el control de la proliferación; las características clave de los genes están resumidas en la Figura 2b.

35 Para confirmar que el gen identificado mediante la secuencia de ADN del ARNhc era, en efecto, objeto de interferencia, se investigó el nivel de expresión de citas proteínas codificadas. Se observó una interferencia génica casi completa en el caso del receptor LIF y el RFC1, mientras que se observó una interferencia génica parcial en el caso de MYD88, RNPnh I y hHR23B (para el LIF, la calidad del anticuerpo era muy deficiente, y no había disponible un anticuerpo para el PP4R1, de modo que estos dos genes no pudieron ser validados finalmente). También se llevó a cabo la RT-PCR usando cebadores específicos de genes para determinar los niveles de ARN de estos genes en células que contenían el inserto pRetroSuper (Figura 3a).

45 Se comparó la secuencia dentro del vector pRetroSuper con la del ARNip sintético que tiene como diana la misma secuencia que el inserto pRetroSuper. También se investigaron otros dos ARNip sintéticos derivados de otras regiones de ARN y que se había demostrado previamente que causaban la interferencia génica del RFC-1 y el hHR23B (Anderson y Perkins, 2003; Glockzin *et al.*, 2003). Para el hHR23B, la secuencia de ARNip tomada del vector pRetroSuper produjo una interferencia génica eficiente cuando se introdujo como un ARNip después de 48 horas, mientras que otras dos secuencias sintéticas no relacionadas que tenían como diana el ARN del hHR23B (HI y HII) también produjeron una interferencia génica eficiente (Figura 4). El nivel de interferencia génica producido por el ARNhc del hHR23B después de un tratamiento de 48 horas fue comparable al de las células con interferencia estable. La interferencia del RFC-1 por parte de las otras dos secuencias (RA y RB) fue muy eficiente después de 48 horas, mientras que el ARNip sintético contra la secuencia procedente del inserto pRetroSuper no causó interferencia génica después de un tratamiento de 48 horas (Figura 4). El nivel de interferencia génica por parte del ARNhc A y B fue comparable al de las líneas celulares estables procedentes de la cribado. Las discrepancias en el nivel de interferencia génica podrían ser consecuencia de los diferentes mecanismos, ya que un ARNip puede ser más o menos efectivo dependiendo del procedimiento de distribución (por ejemplo, expresión transitoria en contraposición a estable).

60 Para validar el papel de los genes identificados a través de la cribado en la regulación de la sensibilidad a la inhibición de HDAC, los inventores evaluaron el efecto de la interferencia en la inhibición de HDAC. Considerando el Rad23B y el RFC1, la introducción de ARNip contra regiones diferenciadas de cada gen redujo la sensibilidad de las células U2OS a la apoptosis inducida por los inhibidores de HDAC (Figura 5). Para el RFC1 del ARNip, la reducción en el nivel de apoptosis fue muy significativo, llegando a alcanzar un 35%. Así, el efecto del RFC1 del ARNip valida el enfoque como una plataforma para identificar genes que influyen en la sensibilidad a los inhibidores de HDAC.

65 Es importante que la plataforma pueda ser aplicada ahora a otros tipos de fármacos, particularmente

cuando el cese de la proliferación celular sea el resultado del tratamiento con el fármaco. Es muy probable que los sistemas involucrados en la apoptosis mediada por los inhibidores de HDAC sean muy diversos, pero, a través de la cribado de interferencia génica funcional de ARNi aquí descrita ha sido posible identificar los sistemas reguladores vitales afectados por los inhibidores de HDAC y necesarios para el resultado apoptótico.

Es posible que las propias proteínas identificadas por medio de la cribado de interferencia génica estén modificadas por acetilación o, alternativamente, interactúen con otras proteínas sometidas a control de acetilación, permitiéndoles que sean modificadas y funcionen en sistemas requeridos para la apoptosis. Dilucidar el papel de estas novedosas proteínas efectoras puede identificar los sistemas esenciales que son diana de los inhibidores de HDAC y necesarios para la inducción de apoptosis. Del mismo modo, estos genes podrían codificar biomarcadores que permiten que los tumores sean estratificados en agrupaciones que es probable que experimenten respuestas más favorables a los inhibidores de HDAC. Lo más importante es que la estrategia de cribado aquí descrita es aplicable generalmente, porque puede ser aplicada a fármacos para el cáncer contra otras dianas.

15 Referencias

- Anderson LA y Perkins ND. (2003) Regulation of RelA (p65) function by the large subunit of replication factor C. *Mol. Cell. Biol.* 23 (2) 721-732.
- Bedalov A, Gattaboni T, Irvine WP, Gotschling DE, y Simon JA. (2001) Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 15113-15118.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. y Agami, R. (2002a). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243-247.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., y Agami, R. (2002b). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Butler LM, Zhou X, Xu W-S, Scher HI, Rifkin RA, Marks PA y Richon VM. (2002). The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cells growth, upregulates thioredoxin-binding protein-2 and down-regulates thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, (18) 11700-5.
- Della Ragione F, Criniti V, Della Pietra V, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T, Zappia V. (2001) Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Letters* 499, (3) 199-204.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRb family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245-2262.
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG y Davidson Sk (2003). Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 2, 151-163.
- Glockzin S, Ogi F-X, Hengstermann A, Scheffer M and Blattner C (2003). Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. *Mol. Cell. Biol.* 23 (24) 8960-969.
- Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D and Schreiber SL. (2001). Identification of a class of small molecular inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J. Biol. Chem* 276 (42) 38837-38843.
- Inche, A. y La Thangue, N.B. (2006) Chromatin control and cancer drug discovery: realising the promise. *Drug Discovery Today* (en fase de impresión).
- Jacobson, S. & Pilus, L. (1999). Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr. Op. Genet. Dev.* 9, 175-184.
- Johnstone, R. W. (2002). Histone deacetylase inhibitors: novel drugs for treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug. Disc.* 1, 287-299.
- Johnstone RW. (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 4:287-99.
- Liang P and Pardee AB (2003). Analysing differential gene expression in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 869-876.
- McLaughlin, F. & LaThangue, N. B. (2002). Tumour classification for tailored cancer therapy. *Ann. Rep. in Med Chem.* 37, (Ch 23) 225-233.
- McLaughlin, F. y La Thangue, N.B. (2003). Histone deacetylase inhibitors in psoriasis therapy. *Inflammation and Allergy.* 3, 213-219.
- Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkin RA. (2001) Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Opin Oncol.* 6 477-83.
- Mitsiades CS Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpue R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhn D, Munshi N, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Richon VM, Marks PA y Anderson KC. (2004). Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (2) 540-545.
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engelend M, Weijenberg MP, Herman JG y Baylin S. (2002). A genomewide screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genetics* 31 (2) 141-149.
- Van Lint C, Emiliani S, Verdin E. (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expression.* 5 (4-5) 245-53.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S-I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L. & Weinberg, R. (2001). hSIR2 (SIRT1) Functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-159.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> ISIS INNOVATIONS LIMITED
 <120> METODO DE CRIBADO
 <130> P056468EP

10 <140> PCT/GB2007/001086
 <141> 2007-03-27
 <150> GB 0606096.6
 <151> 2006-03-27

15 <160> 21
 <170> SeqWin99, version 1.02

20 <210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 1
 gatgcaacga gtgcactg 19

30 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Cebador de PCR

<400> 2
 cagattaagg gtgctatga 19

35 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 3
 acacaacttc agtcgatag 19

45 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 4
 ggaccgttta tcatgagc 18

55 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 acacagcttt ccacagggc 19

60 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

65 <400> 6
 caacctggac aagctatgt 19

- <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 caacctggac aagctatgt 19

 10 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 8
 caggccgtgg tactgatta 19

 <210> 9
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 taatcagtac cacggcctg 19
 25
 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 10
 ttaatatatg acagcagtc 19

 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 11
 gagatcgtgc gcttcgaca 19
 40
 <210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> 10
 50 <223> n = a, c, t or g

 <400> 12
 gtgcagtatn agcctgag 18

 55 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 60 <400> 13
 agatctccat gaggcacga 19

 <210> 14
 <211> 19
 65 <212> ADN

<213> Homo sapiens
 <400> 14
 5 acatgagaca aagaatagc 19
 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 15
 atcacgtctt tactgaaga 19
 <210> 16
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 20 ggatatacca actgggcta 19
 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 gttaagccgc cagttcacc 19
 30 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 18
 gaaattagcc tgagcactg 19
 <210> 19
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> característica miscelánea
 45 <222> 6
 <223> n = a, t, c or g
 <400> 19
 50 ttaacnggac aaactatgt 19
 <210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 20
 60 cccttgacc tcctcgttcg acc 23
 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 569 663 T3

<220>

<223> Cebador de PCR

5

<400> 21

cagacgtgct acttcattt gtc 23

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un procedimiento para diagnosticar la susceptibilidad de un individuo que padece de una enfermedad al tratamiento con un inhibidor de HDAC, el procedimiento comprendiendo evaluar el nivel de expresión o actividad de un gen o sus productos de expresión, o la secuencia de un gen, en una muestra de un paciente y comparar dicho nivel de expresión o actividad o secuencia con una referencia, en donde el nivel de expresión o actividad o secuencia que es diferente a dicha referencia es indicativo de una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC en relación con el estado de referencia, y en donde dicho gen es hHRAD23B (rad 23B humano).
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde un nivel que es significativamente más alto que el nivel de referencia indica que el individuo es más susceptible al tratamiento con un inhibidor de HDAC.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde un nivel que es significativamente más bajo que el nivel de referencia es indicativo de una resistencia potencial del individuo al tratamiento con un inhibidor de HDAC.
- 20 4. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en donde el producto de la expresión es una proteína, y en donde opcionalmente el método comprende las etapas de:
- a) poner en contacto un ligando de dicha proteína con una muestra de un paciente bajo condiciones adecuadas para la formación de un complejo ligando-proteína; y
 - b) detectar dicho complejo
- 25 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el producto de la expresión es ARNm, y en donde opcionalmente el procedimiento comprende las etapas de:
- a) aislar una molécula de ácido nucleico que codifica hHRAD23B a partir de una muestra de un paciente que se está probando para la enfermedad; y
 - b) diagnosticar al paciente detectando la presencia de una mutación que está asociada con una susceptibilidad alterada al tratamiento con el inhibidor de HDAC.
- 30 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha muestra es una muestra de tejido.
- 35 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha muestra es sangre, orina, saliva o una biopsia de tejido específica.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

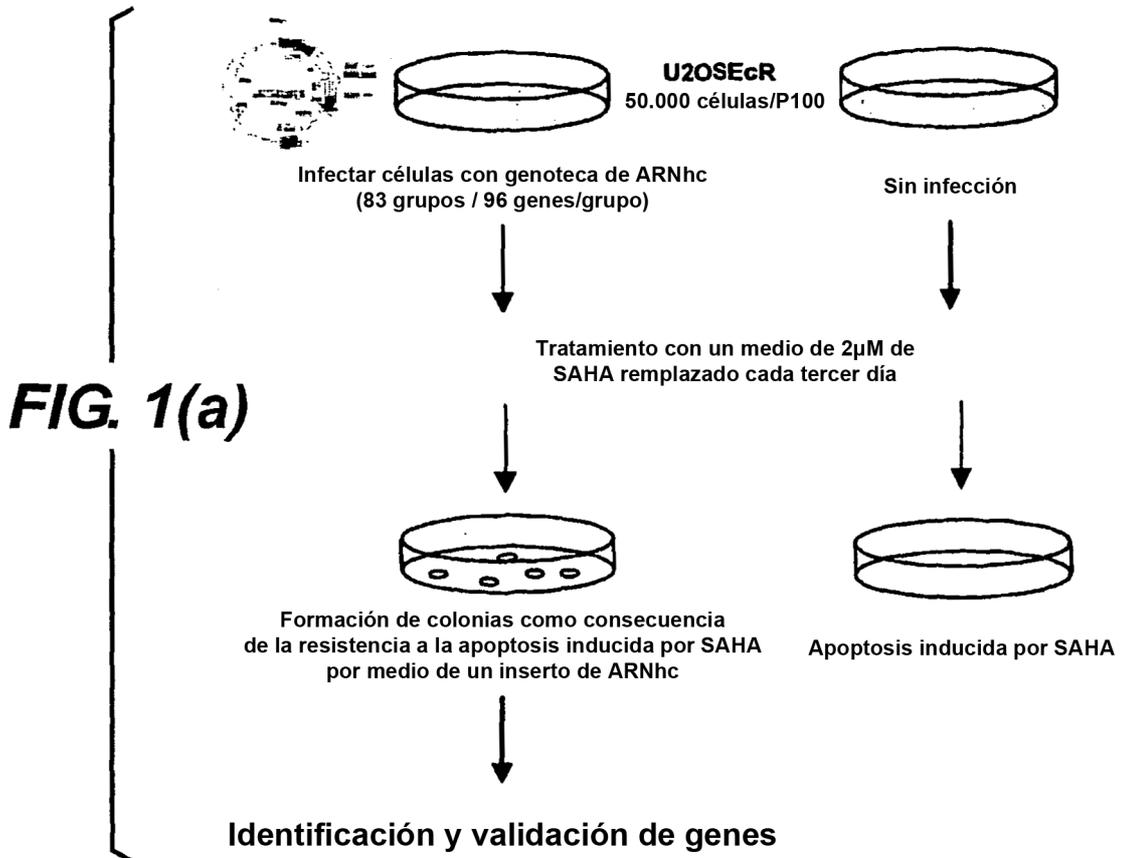


FIG. 1(b)

Número de grupo	Cosecha de colonias			
	1	2	3	4
11				
14				
28	1	1	1	1
29				
33				
37	3	1		
48	1		3	
51	20	4	5	21
52	19	31		16
53	1			
70	4			
72				
74	2			
77				
81				
TOTAL DE COLONIAS	51	37	6	38

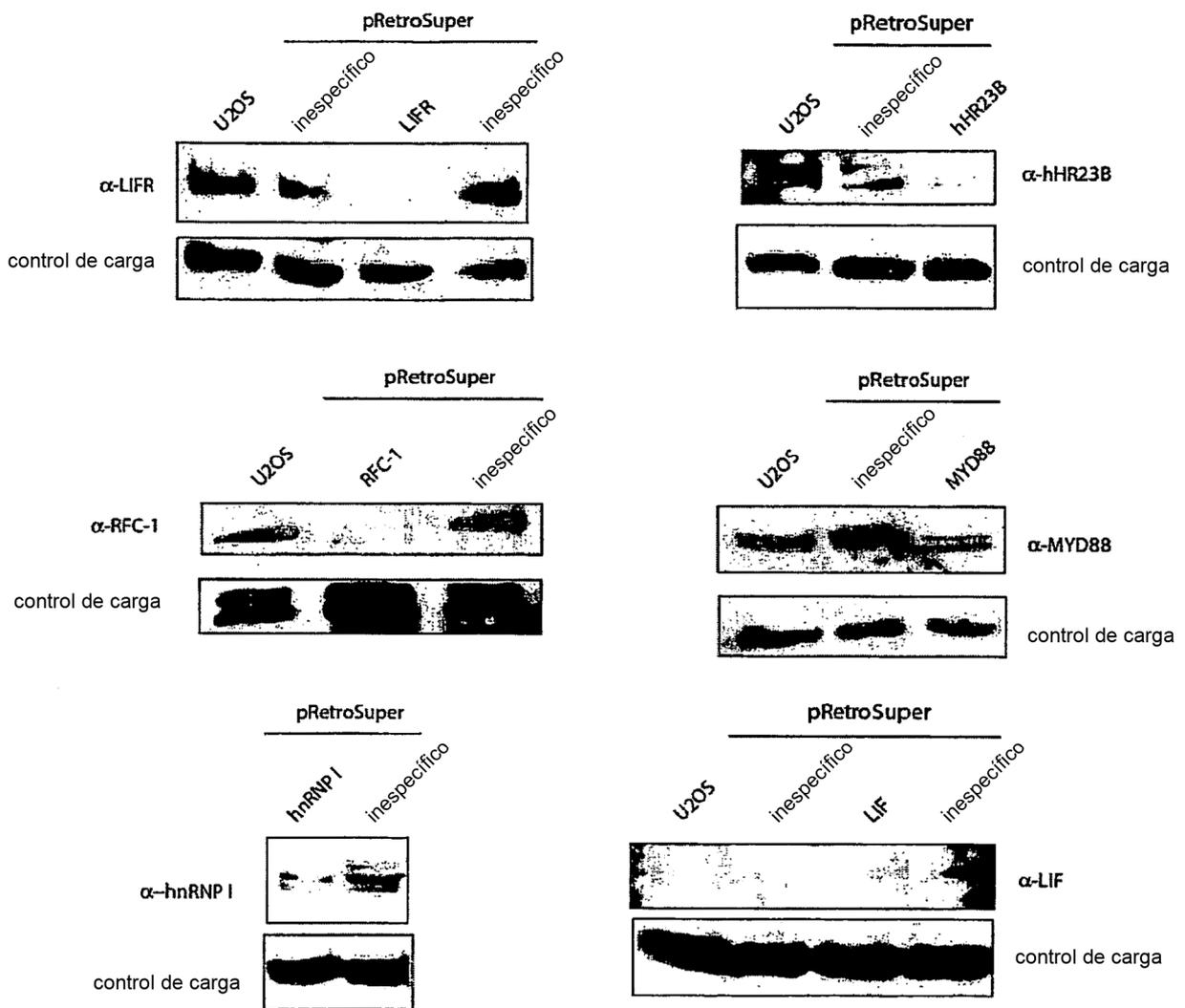
FIG. 2(a)

Probabilidad	Gen	ID del gen	Nombre	Grupo	Colonia	Nº de Coincidencia de ID Secuencia aciertos del grupo	Secuencia
elevada	hHRAD238	NM_002874	rad humano 23B	52	1	2	GATGCAACGAGTGCACTTG
	RFC1	NM_002913	factor de replicación C1	52	3	2	CAGATTAAGGGTGTATGA
	MYD88	NM_002468	gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide	52	4	1	ACACAACCTCAGTCGATAG
	PTBP1	NM_002819	proteína 1 de enlace de trazo de polipirimidina	52	8	1	GGACCGTTTATCATGAGC
	PPP4R1	NM_005314	subunidad 1 reguladora de la proteína fosfatasa 4	46	1	1	ACACAGCTTCCACAGGGC
	LIF	NM_002309	factor inhibidor de la leucemia	51	4	11	CAACCTGGACAAGCTATGT
	LIFR	NM_002310	receptor del factor inhibidor de la leucemia	51	9	1	CAGGCCGTGGTACTGATTA
	SCGB2A2	NM_002411	secretoglobina, familia 2A, miembro 2	51	19	1	JTAATAIATGACAGCAGIC
	HLA-0081	NM_002123	complejo principal de histocompatibilidad, clase II, DQ beta 1	51	20	1	TTAATATATGACAGCAGTC
	PVRL1	NM_002855	receptor atípico 1 de poliovirus	52	9	1	GAGATCGTGCCTTCGACA
media	SERPA10	NM_016186	serpina A10	74	2	2	GTGCAGTATNAGCCTGAG
	HEXB	NM_000521	hexosaminidasa B	70	1	1	AGATCTCCATGAGGCACGA
	PPAT	NM_002703	fosfotransferasa	52	5	1	ACATGAGACAAAAGAAATAGC
	LDHB	NM_002300	lactato dehidrogenasa B	51	15	2	ATCACGCTCTTACTGAAGA
	MAN2A1	NM_002372	miembro 1 de la manosidasa 2A	51	2	3	GGATATACCAACTGGGGCTA
	PLECK2	NM_016445	pleckstrina 2	51	14	1	GTTAAGCCGCCAGTTCACC
	SART2	NM_013352	antígeno del carcinoma de células escamosas reconocido por células T	51	7	1	GTTAAGCCGCCAGTTCACC
				74	1	2	GAAATTAGCCTGAGCACTG
				28	1	2	GAAATTAGCCTGAGCACTG
				37	2	1	GAAATTAGCCTGAGCACTG
baja				51	7	1	TTAACNGGACAAAACCTATGT

FIG. 2(b)

Gen	Nombre(s)		Función principal	Localización	Proteínas asociadas
RFC-1	factor de replicación C1	p140	facilita la carga de PCNA en sitios de síntesis de ADN	núcleo	BRCA1, ATM, Rb, C/EBPa, HDAC1
hHR23B	rad humano 23B		modula la transferencia de proteínas del sitio de ubiquitinación al proteasoma	núcleo/citoplasma	componente del proteasoma 19S, hdm2, p53
PP4R1	subunidad 1 reguladora de la proteína fosfatasa 4		se enlaza con la subunidad catalítica PP4 y regula la actividad de la fosfatasa de la misma	núcleo/citoplasma	PP4C, HDAC3
MYD88	marcador 88 de diferenciación mielóide		molécula adaptadora general implicada en la señalización de la familia de receptores Toll	núcleo/citoplasma	NF-κB, IL 1RAP, IRAK2
PTBP1	proteína 1 de enlace de tracto de polipirimidina	RNPnh I	ARN acompañante implicado en el corte y el empalme de preARNm	núcleo/citoplasma	Apaf-1, TLS/FUS
LIF	factor inhibidor de la leucemia		citoquina polifuncional	citoplasma	HGF, BMP2
LIFR	receptor α-subunidad del factor inhibidor de la leucemia	LIFRα	se combina con gp130 para formar el receptor del LIF, implicado en la señalización de varias citoquinas	membrana celular	LIF, SHP-2

FIG. 3



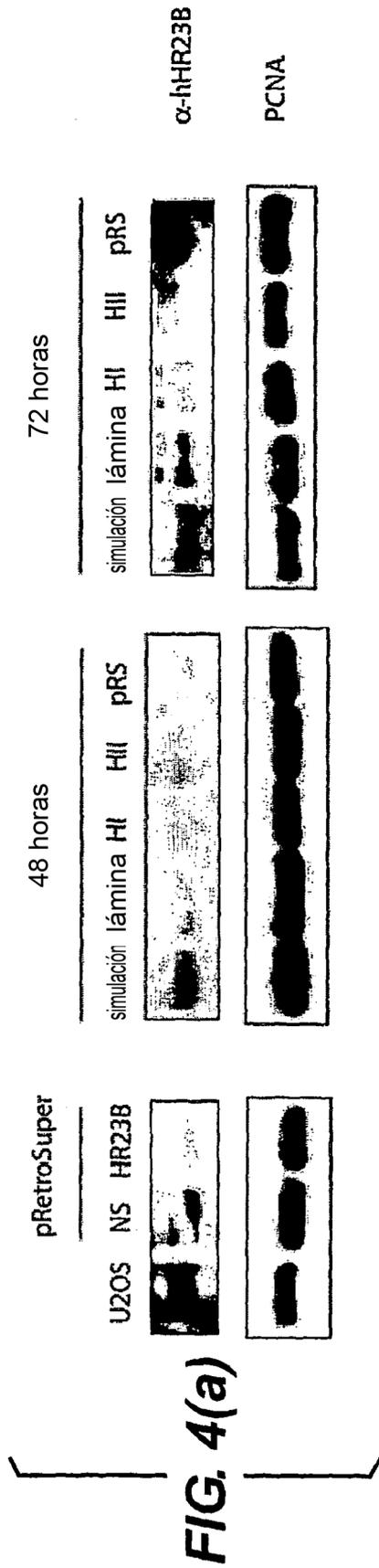


FIG. 5(a)

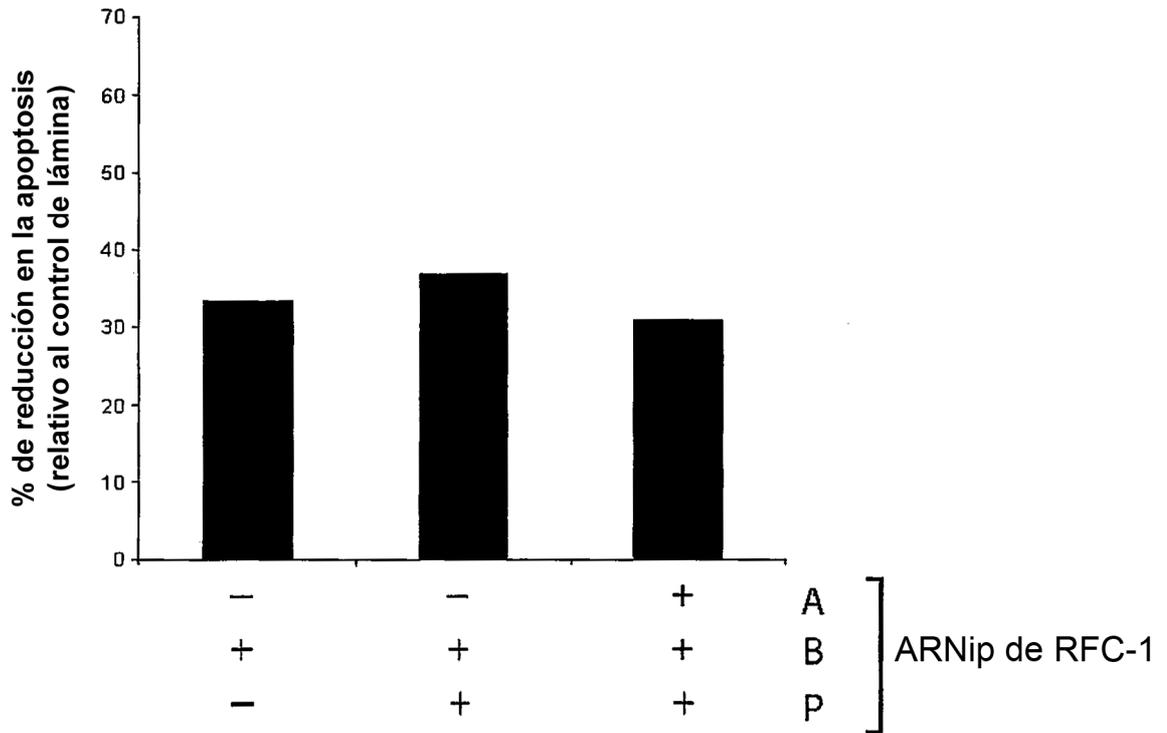


FIG. 5(b)

