

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 535**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2006 E 06836496 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 1948827**

54 Título: **Mutaciones del oncogén de C-kit en melanomas**

30 Prioridad:

21.10.2005 US 729171 P

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

15.07.2016

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
(100.0%)
1111 FRANKLIN STREET 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**BASTIAN, BORIS, C. y
CURTIN, JOHN, A.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 577 535 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutaciones del oncogén de C-kit en melanomas

Declaración de derechos en cuanto a las invenciones realizadas bajo investigación o desarrollo federalmente patrocinado

- 5 Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo la concesión N°. CA95300 concedida por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

10 Entre los melanomas que afectan a la piel, hay una marcada variación de las características histopatológicas y clínicas, dependiendo parcialmente de la localización anatómica y de los patrones de exposición al sol. Recientemente se ha demostrado (Curtin, et al., *New Engl. J. Med.* 353: 2135-2147, 2005) que las rutas de MAP-quinasa y PI3 quinasa se activan de forma diferente entre los subtipos de melanoma cuando los tumores se clasifican de acuerdo a una combinación de la exposición UV y del sitio anatómico. De manera prominente, aunque las mutaciones de BRAF son altamente prevalentes (59%) en los melanomas que se producen en la piel sin signos de daño crónico inducido por el sol (melanomas no CSD), la frecuencia es muy baja en los melanomas que se producen en las palmas de las manos, plantas de los pies o los sitios subungueales (acral o mucosal). Las mutaciones BRAF también son poco comunes en los melanomas que se producen en la piel que muestra evidencias de daño crónico inducido por el sol (melanomas CSD). Alrededor del 10 al 20% de los melanomas de todos los subtipos activan estas rutas por mutación de las NRAS, pero tanto las mutaciones BRAF como NRAS nunca ocurren al mismo tiempo. Estos resultados plantean la cuestión fundamental de cómo la ruta de la MAP quinasa puede ser activada en aquellos tumores que no tienen las mutaciones NRAS o BRAF.

20 El análisis de CGH de matriz de Curtin et al., supra, encontró diferencias en las características de las aberraciones del número de copias de ADN entre los subtipos de melanoma, con diferencias significativas en la frecuencia de la participación de varios loci. El examen de los perfiles de número de copias de 103 melanomas primarios de este estudio halló el aumento (10 tumores) o la amplificación (7 tumores) del cromosoma 4p12. Dieciséis de estos tumores se habían secuenciado para BRAF y NRAS y no se encontraron mutaciones. Todos los 17 tumores fueron de los subtipos acral, mucosal o CDS.

25 La región 4p12 común de elevación del número de copias contiene varios receptores de tirosina quinasa (RTK) que son atractivos oncogenes candidatos de melanoma. Estos incluyen el v-kit Hardy-Zuckerman 4 KIT del homólogo del oncogén viral de sarcoma felino, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular KDR y el receptor del factor alfa de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA). El KIT es un gen importante para la supervivencia de melanocitos y su desarrollo (Chabot, et al, *Nature* 335: 88-89, 1988; Geissler, et al, *Cell* 55: 185-192, 1988) y está sujeto a mutaciones oncogénicas en una variedad de tipos de cáncer (Beghini et al, *Cancer* 92: 657-662, 2001; Beghini et al, *Blood Cells Molecules and Diseases* 24: 262-270, 1998; Isozaki, et al, *Am J. Path.* 157: 1581-1585, 2000; Lux, et al., *Am. J. Path.* 156:791-795, 2000; Wardelmann, et al., *Mod. Pathology* 15: 125-136, 2002). Sin embargo, investigaciones anteriores han descartado en general su importancia en el melanoma porque la expresión parecía estar perdida durante la progresión tumoral (Lassam y Bickford, *Oncogene* 7: 51-56, 1992; Natali, et al, *Int. J. Cancer* 52: 197-201, 1992; Zakut, et al, *Oncogene* 8: 2221-2229, 1993; Huang, et al, *Oncogene* 13: 2339-2347, 1996; Montone, et al., *Mod. Pathology* 10: 939-944, 1997). El KDR es importante en la angiogénesis (Millauer, et al, *Cell* 72: 835-846, 1993) y en el desarrollo de tumores sólidos (Millauer, et al., *Nature* 367: 576-579, 1994) y se expresa comúnmente en melanoma (Straume y Akslen, *Am J Pathol* 159: 223-235, 2001). El PDGFRA se encuentra que se activa por mutaciones o deleciones pequeñas en un subconjunto de tumores gastrointestinales estromales (GIST) (Heinrich, et al, *Science* 299: 708-710, 2003) y en la leucemia mieloide aguda infantil (Heinrich, et al., *Science* 299: 708-710, 2003).

30 Las proteína-tirosina fosfatasas (PTPasas) son un conjunto de moléculas altamente pleomórficas con papeles en la regulación de las respuestas de las células eucariotas a señales extracelulares mediante la regulación del contenido de fosfotirosina de las proteínas intracelulares específicas. Las PTPasas de mamíferos han sido divididas en dos amplias categorías: (1) PTPasas del receptor transmembrana que contienen dominios catalíticos vinculados citoplásmicos y (2) PTPasas intracelulares. Dentro de la segunda categoría está una PTPasa denominada SHP2 que contiene dos dominios de homología 2 (SH2) de SRC en tándem situados en el extremo terminal amino de la proteína. Los dominios SH2 permiten que SHP2 se una a los restos de fosfotirosina específicos dentro de las secuencias de proteínas. Las mutaciones dentro de SHP2, más específicamente dentro de las regiones de SH2 de SHP2 se han asociado con diversos trastornos, tales como: síndrome de Noonan, síndrome de LEOPARD, leucemia mielomonocítica juvenil, leucemia monoblástica aguda y varios neuroblastomas. El SHP2 opera inmediatamente cadena abajo de KIT y las células que expresan el mutante SHP-2 se ha mostrado que se sensibilizan frente al factor de células madre (SCF), el ligando para KIT, resultando la estimulación en una señal prolongada y más intensa de p-ERK con una duración de hasta 60 min (Niimi, et al., *Leukemia* 20, 635-644, 2006).

55 La presente invención se basa en el descubrimiento de ciertos melanomas dependientes de KIT, por ejemplo, melanomas mucosales, acrales, oculares, tales como el conjuntival, o CSD.

Breve resumen de la invención

- La invención se define por las reivindicaciones 1-20. Se proporcionan en este documento métodos para detectar un melanoma c-Kit-dependiente, por ejemplo, un melanoma de la mucosa; un melanoma acral; uno ocular, por ejemplo, un melanoma conjuntival; o un melanoma CSD. Los métodos comprenden la detección de una mutación de secuencia y/o la amplificación o sobreexpresión de c-KIT en células de melanoma de un paciente. Los métodos se pueden utilizar para indicaciones de diagnóstico y de pronóstico y, por ejemplo, para la identificación de pacientes con melanoma que son sensibles a los inhibidores de c-kit. La invención también proporciona métodos de tratamiento de melanoma que comprenden la administración de un inhibidor de c-Kit a un melanoma c-Kit-dependiente.
- La descripción además proporciona métodos de detección de melanoma, por ejemplo, melanomas de la mucosa, acrales, oculares, por ejemplo, conjuntivales, y CSD, mediante la detección de la presencia de una mutación en SHP-2.
- Por lo tanto, se describe en este documento un método de detección de melanoma en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de piel, que comprende células de melanoma de un paciente que tiene melanoma o se sospecha que tiene melanoma, comprendiendo el procedimiento la detección de una mutación de secuencia o un aumento en el número de copias de c-KIT, o la sobreexpresión de c-KIT en células de melanoma presentes en la muestra biológica, en el que la presencia de una mutación de la activación de c-KIT o la presencia de un aumento en el número de copias de c-KIT es indicativa de la presencia de melanoma. Por lo general, el melanoma es el melanoma acral, melanoma mucosal, el melanoma CDS, u ocular, por ejemplo, el melanoma conjuntival. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende la detección de los niveles de un ácido nucleico c-KIT, por ejemplo, ARNm o ADN genómico. En realizaciones típicas, tales etapas de detección comprenden una reacción de amplificación, tales como PCR o RT-PCR. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende detectar los niveles de expresión de la proteína c-KIT o la detección de una mutación en la proteína c-KIT. En algunas realizaciones, la etapa de detección puede comprender la detección de múltiples defectos c-kit, por ejemplo, la detección de una mutación de secuencia y los cambios del número de copias.
- Las células de melanoma c-KIT dependientes también se pueden detectar mediante la detección de una mutación en la secuencia de SHP2. En alguna realización, el análisis de la presencia de una mutación de secuencia en SHP2 se lleva a cabo, además de la detección de defectos en c-KIT en el melanoma. La mutación SHP2 se detecta a menudo en el dominio de la proteína tirosina fosfatasa. Por ejemplo, la mutación puede ser P491L, 1309V o S150F en los exones 13, 8 y 4, respectivamente. La mutación puede detectarse mediante el análisis de cualquiera de los ácidos nucleicos o proteínas. Típicamente, la mutación se detecta mediante el análisis de ácidos nucleicos, por ejemplo, ARN o ADN genómico, a partir de una muestra biológica del paciente.
- Típicamente, la etapa de detección comprende detectar la presencia de una mutación de una secuencia en un c-KIT o SHP2. Esto se logra a menudo, por ejemplo, mediante el análisis de los ácidos nucleicos de la muestra biológica. El ácido nucleico puede ser una muestra de ADN o ARN. La muestra de ADN puede ser derivada de la transcripción inversa del ARN, o puede ser ADN genómico. A menudo, la etapa de detección para detectar la mutación comprende una reacción de amplificación.
- En algunas realizaciones, el melanoma es de un paciente que tiene, o se sospecha que tiene, un melanoma acral, un melanoma de la mucosa, uno ocular, por ejemplo, melanoma conjuntival, o CSD.
- En realizaciones adicionales, la etapa de detección comprende detectar la presencia de una mutación en el exón 11, 13, 17 ó 18 de c-KIT.
- En otras realizaciones de la invención, el melanoma acral, melanoma CSD, melanoma de la mucosa, o melanoma ocular, por ejemplo, el melanoma conjuntiva, se detecta mediante la detección de un aumento en el número de copias del gen c-KIT y / o la sobreexpresión del producto génico. Los métodos de detección se realizaron como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la sobreexpresión se puede detectar mediante la evaluación de los niveles de mRNA o proteína. El número de copias se puede evaluar, por ejemplo, por métodos o procedimientos de amplificación tales como la hibridación in situ.
- También se proporciona un método para detectar la presencia de células de melanoma a partir de un melanoma que surja en las palmas, plantas, debajo de las uñas, de las membranas de las mucosas, de la piel crónicamente expuesta al sol o de los ojos, por ejemplo, la úvea o conjuntiva, comprendiendo el método detectar un aumento del número de copias de c-KIT, o una mutación en una secuencia del gen c-KIT o un gen SHP2.
- En otras realizaciones, la presencia de células de melanoma de un melanoma que surge en las palmas, plantas, debajo de las uñas, membranas mucosas, piel expuesta al sol de manera crónica o melanoma ocular puede ser detectada mediante la detección de la sobreexpresión de c-Kit.
- La descripción también proporciona un método de monitorización de la progresión de melanoma, por ejemplo, en un paciente sometido a un régimen de tratamiento de melanoma, en un paciente que tiene un melanoma acral, mucosal, CSD u ocular, por ejemplo, conjuntival o uveal, comprendiendo el método detectar la presencia de una

proteína c-KIT mutada o ácido nucleico; o una proteína de SHP-2 mutada o ácido nucleico, en una muestra biológica del paciente.

5 En algunas realizaciones, el seguimiento de la progresión del melanoma en un paciente que tiene un melanoma acral, mucosal, CSD u ocular se realiza mediante la detección de un aumento en el número de copias de c-KIT, con relación a un control normal, en una muestra biológica del paciente; o mediante el control del número de células de melanoma que tienen un c-KIT o mutación de secuencia SHP2 en una muestra sospechosa de que comprenda células de melanoma.

10 En otras realizaciones, el seguimiento de la progresión del melanoma en un paciente que tiene un melanoma acral, mucosal, CSD, u ocular, por ejemplo, conjuntival se realiza mediante la detección de un aumento de la expresión de c-KIT, con relación a la normalidad, en una muestra biológica del paciente.

Típicamente, en el seguimiento de la progresión del melanoma, la presencia de un número reducido de células de melanoma c-KIT-dependientes en la muestra biológica es indicativa de una respuesta terapéutica frente a la del agente de tratamiento en el paciente.

15 En todos los métodos de detección descritos en este documento, la muestra biológica puede provenir de cualquier fuente en el cuerpo que se sospeche que contiene células de melanoma primarios o metastásicos. Por lo tanto, la muestra biológica puede ser de piel, por ejemplo, la piel acral, del ojo, por ejemplo, la conjuntiva, o de las membranas mucosas, y en otras realizaciones, puede ser de sangre, suero, tejido de los nódulos linfáticos, o tejido de órganos viscerales. En algunas realizaciones, por ejemplo, en el seguimiento de la progresión del melanoma, la muestra es de un tejido fácilmente accesible tal como la sangre.

20 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para determinar si un paciente con melanoma es un candidato para recibir una terapia que inhiba la actividad de c-Kit. El método comprende determinar si el melanoma que el paciente tiene comprende células de melanoma que tienen un aumento en el número de copias c-KIT y/o sobreexpresan c-kit y/o que tienen una mutación en la secuencia de c-Kit o SHP2. La detección se realiza de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En consecuencia, la etapa de detección puede comprender la detección de niveles de mRNA o de proteínas. En otras realizaciones, la etapa de detección puede comprender la detección de la presencia de una mutación c-kit en una muestra de ácido nucleico del melanoma o de una muestra de proteína del melanoma. La muestra de ácido nucleico puede ser ARN o ADN, por ejemplo, ADN genómico o cADN hecho a partir de ARN de la muestra de melanoma. A menudo, la etapa de detección comprende una reacción de amplificación, tal como PCR o RT-PCR.

30 En realizaciones típicas, el melanoma es un melanoma acral, un melanoma de la mucosa, un melanoma ocular, por ejemplo, un melanoma conjuntival, o un melanoma CSD.

35 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para inhibir la proliferación de células de melanoma c-KIT-dependientes, comprendiendo el método la administración de un inhibidor de c-KIT. El inhibidor de c-KIT, puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, tal como mesilato de imatinib, dasatinib, sunitinib; un anticuerpo; o un péptido. Típicamente, las células de melanoma son de un melanoma acral, un melanoma de la mucosa, uno ocular, por ejemplo, el melanoma conjuntival, o un melanoma CSD.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: paneles que muestran las muestras representativas de la piel correspondientes a las puntuaciones de daño crónico del daño inducido por el sol (CDS) de CDS 0 a CDS 3.

40 Figura 2: Dos melanomas con amplificación, mutación y sobreexpresión de KIT. El panel de la izquierda muestra los datos del conjunto CGH con la relación log 2 del tumor para hacer referencia a la intensidad de fluorescencia en el eje y, y la posición genómica de los clones BAC en megabases en el eje x. Una relación log 2 de 0 indica el número de copias normales. Los clones BAC con una mayor proporción de 0,9 se consideran amplificados. Las flechas indican la localización del lugar de KIT. Los paneles centrales muestran las trazas de secuenciación del ADN del tumor y el tejido normal adyacente. En el ADN del tumor, los picos para el alelo mutado son más altos que los alelos de tipo salvaje lo que indica la amplificación del alelo mutado. Los paneles de la derecha muestran una fuerte expresión de la proteína KIT en el frente invasivo del melanoma por inmunohistoquímica. En el caso de AM210 KIT, un agregado de células que expresan KIT se encuentra en un espacio linfático (cabezas de flecha).

50 Figura 3: Distribución de frecuencias de las alteraciones genéticas en BRAF, NRAS y KIT entre los cuatro grupos de melanoma. NoCSD = melanomas en la piel sin daño crónico inducido por el sol como lo demuestra la marcada elastosis solar; CDS = melanomas en la piel con daño crónico solar inducido como lo demuestra la marcada elastosis solar; acrales = melanomas en las plantas de los pies, palmas, o en los sitios sub-ungueales; mucosas = melanomas en las membranas de la mucosa.

55 Figura 4: La pérdida y la mutación de SHP2 en un melanoma primario. El panel izquierdo muestra el perfil del conjunto CGH del cromosoma 12 para un melanoma primario con una pérdida limitada de 12q24.13 que contiene SHP2 (punta de la flecha). El eje Y muestra la relación entre la relación log 2 para cada locus normalizado con la

relación log 2 mediana del genoma. El eje X muestra la posición genómica de los loci a partir de datos de la página web UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu; ensamblaje Julio de 2003). El panel derecho muestra las trazas de secuenciación del exón 13 de SHP2 que muestra una transición de C a T que resulta en una sustitución de aminoácidos P491L. La altura del pico de las trazas de secuenciación indica que la pérdida en 12q24.13 reconoce al alelo normal.

Descripción detallada de la invención

Introducción

Se proporcionan en este documento métodos, reactivos y kits, para el diagnóstico del cáncer, para usos de pronóstico y para el tratamiento de melanomas. Se muestra que el c-Kit es un oncogén en el melanoma, y una diana terapéutica en los melanomas, por ejemplo, melanomas de las membranas de las mucosas, melanomas acrales, melanomas de la piel crónicamente dañada por el sol, y melanomas oculares, tales como melanomas conjuntivales.

El KIT es una glicoproteína transmembrana de 145 kd que es el producto del gen KIT, el homólogo celular normal del oncogén del virus del sarcoma v-kit felino. Es un miembro de la familia de tirosina quinasa subclase III y está estrechamente relacionado con los receptores para y el ligando de PDGF, M-CSF, FLT3. El ligando para KIT, el factor de células madre (SCF) promueve la dimerización y la autofosforilación de los receptores de kit. Los restos de tirosina fosforilados resultantes proporcionan sitios de unión para moléculas de señalización que contienen dominios SH2, incluyendo fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa. Estas moléculas de señalización activan una variedad de dianas corriente abajo. La señalización de KIT es importante para el desarrollo normal y la supervivencia de melanocitos, así como otras células. La importancia de c-KIT en tumores malignos ha sido bien documentado (véase, por ejemplo, Heinrich et al., J. Clin. Oncology 20: 1692-1703 para una revisión)

La capacidad de detectar las células de melanoma en virtud de la detección del número de copias incrementado de c-KIT, los niveles de expresión y/o una forma mutante (secuencia) de c-Kit, es útil para cualquiera de un gran número de aplicaciones. Por ejemplo, se puede usar, solo o en combinación con otros métodos de diagnóstico, para el diagnóstico de melanomas, o un cierto tipo de melanoma, en el paciente. También se puede utilizar para identificar melanomas particulares que son sensibles a los agentes terapéuticos, tales como agentes terapéuticos que se dirigen a ciertos tirosina quinasa receptoras, por ejemplo, mesilato de imatinib (mesilato se designa químicamente como metanosulfonato de 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-irimidinil]amino]-fenil]benzamida), que es un inhibidor de fenilaminopirimidina tirosina quinasa, dasatinib y sunetinib.

La detección de los niveles de c-Kit o la presencia de mutaciones también se puede utilizar para controlar la eficacia de un tratamiento de melanoma. Por ejemplo, el nivel de un polipéptido o polinucleótido c-Kit, o el número de células melanocíticas que tienen mutaciones de secuencia en c-Kit, o un aumento en el número de copias de un gen c-KIT, después de un tratamiento contra el cáncer puede ser en comparación con el nivel de antes del tratamiento. Una disminución en el nivel del polipéptido o polinucleótido c-Kit, o una reducción en el número de células de melanoma que han mutado c-Kit después del tratamiento indican que es un tratamiento eficaz. Además, el nivel de c-Kit y/o la presencia de c-Kit mutado puede ser estadísticamente correlacionado con la eficacia de determinadas terapias anti-melanoma o con los resultados de pronóstico observados, permitiendo de esta manera el desarrollo de bases de datos basados en el que un pronóstico basado en la estadística, o una selección del tratamiento más eficaz, se puede hacer a la vista de un determinado nivel o presencia de diagnóstico de c-Kit.

La detección del nivel de c-Kit o las mutaciones en c-Kit, por ejemplo, en la superficie celular, también puede ser útil para controlar el número o localización de las células de melanoma en un paciente, por ejemplo, para monitorizar la progresión del cáncer en el tiempo.

Las mutaciones SHP2 también se han identificado en melanomas, por ejemplo, melanomas acral, ocular, mucosal o CSD. En consecuencia, la detección de mutaciones de secuencia SHP2 también puede detectar melanomas que son melanomas c-KIT-dependientes y dianas para la terapia utilizando inhibidores de c-KIT.

El c-KIT también puede servir como una diana terapéutica. Por consiguiente, la descripción también proporciona métodos para tratar melanomas, en particular los melanomas que sobreexpresan y/o tienen un c-KIT mutante o SHP2 mutante mediante la administración de inhibidores de c-KIT, por ejemplo, anticuerpos, péptidos, fármacos reconocidos por tirosina quinasa receptoras de pequeñas moléculas, tal como mesilato imatinib u otros inhibidores de moléculas pequeñas y los inhibidores de ácido nucleico de c-KIT.

Definiciones

El término "c-KIT" se refiere al kit de proteína quinasa tirosina proto-oncogén. "C-KIT" se usa indistintamente con "KIT" en esta aplicación. El término abarca ácidos nucleicos y variantes polimórficas de polipéptidos, alelos, mutantes y fragmentos de KIT. Tales secuencias son bien conocidas en la técnica. Secuencias KIT humanas ejemplares están disponibles bajo las secuencias de referencia NM_000222 (secuencia de nucleótidos) en la base de datos de nucleótidos NCBI y el número de entrada P10721 (secuencia polipeptídica). Se proporciona la secuencia de NM_000222 en la SEQ ID NO: 1 como una secuencia de polinucleótidos ejemplar. La secuencia de polipéptido ejemplar P10721 se muestra en SEQ ID NO: 2. El KIT humano comparte una estrecha identidad

estructural con el KIT de otras especies. Por ejemplo, el ácido nucleico KIT primate y las secuencias de proteínas son más del 99% similar al KIT humano. Las secuencias de ácido nucleico y proteína de KIT de rata y de ratón tienen de 80 a 85% de manera similar al KIT humano.

5 El término "SHP-2" se refiere a la proteína-tirosina fosfatasa del tipo 11 no receptora codificada por el gen ptpn11 que se asigna al locus 12q24. El término abarca ácidos nucleicos y variantes polimórficas polipeptídicas, alelos, mutantes y fragmentos de SHP-2. Tales secuencias son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de secuencias SHP-2 humanas están disponibles bajo las secuencias de referencia NM_002834 (secuencia de nucleótidos) en la base de datos de nucleótidos y el número de entrada NCBI NP-002825 (secuencia polipeptídica). La secuencia NM-002834 se ofrece como SEQ ID NO: 3 como una secuencia de nucleótidos ejemplar. La secuencia del polipéptido
10 ejemplar se muestra en la SEQ ID NO: 4.

Un "melanoma dependiente de c-Kit" o "células de melanoma dependiente de c-Kit" tal como se utiliza en el contexto de esta aplicación se refiere a un melanoma que comprende células de melanoma que tienen un defecto (también referido como una "mutación") en c-Kit y/o una mutación de secuencia en SHP-2. El defecto en c-Kit puede ser una mutación de la secuencia c-Kit, un aumento en el número de copias de c-Kit, o la sobreexpresión de c-Kit. Las
15 "células de melanoma dependientes de c-Kit" pueden tener uno o más de tales mutaciones, por ejemplo, las células del melanoma pueden tener un c-KIT y/o una mutación de secuencia de SHP2 y un aumento en el número de copias de c-kit. Un "melanoma dependiente de c-Kit" de la presente invención típicamente es de piel acral, conjuntival o de piel con signos de daño crónico inducido por el sol.

En el contexto de esta solicitud "melanoma acral" se refiere a melanomas que se producen en la piel que no lleva pelo de las palmas o las plantas o debajo de las uñas. Un subconjunto de melanomas acrales son los "melanomas acrales-lentiginosos".
20

La expresión "melanoma de mucosa" se refiere a los tumores que surgen en las membranas mucosas; "melanoma ocular" tal como se usa en el presente documento es el melanoma que surge del ojo. "Melanoma ocular" incluye el melanoma uveal y el conjuntival. El "melanoma conjuntival" se refiere a un melanoma que surge en la conjuntiva.

25 "Melanoma CSD", tal como se utiliza en este documento, se refiere al melanoma que surge de la piel con daño crónico inducido por el sol; y "melanoma NCSD", tal como se utiliza en este documento, se refiere a melanomas derivados de piel sin daño crónico inducido por el sol. La distinción entre los grupos "CSD" y "NCSD" en la presente aplicación se basa en la presencia o ausencia en la microscopía de elastosis solar marcada de la dermis que rodea los melanomas. En casi todos los casos, los melanomas asociados con el daño crónico inducido por el sol (CDS) se
30 producen en la cara y en las extremidades distales, tales como los antebrazos, el dorso de las manos, las espinillas y las pantorrillas. Estos melanomas típicamente aparecen en individuos mayores de 50 años de edad, y microscópicamente, tienen un componente intraepidérmico en el que los melanocitos están dispuestos como unidades solitarias en lugar de nidos. Además, estos melanomas tienden a tener una epidermis atrófica con el borrado de las crestas epiteliales. Un subconjunto de los melanomas CSD es melanomas lentigo maligno. Por el
35 contrario, los melanomas que no estaban asociados al daño crónico inducido por el sol (CNDS) aparecen en el tronco y las extremidades proximales, tales como los muslos y los brazos superiores. Los melanomas CNDS suelen mostrar un componente intraepidérmico en el que los melanocitos se disponen como nidos en lugar de unidades solitarias y muestran una considerable dispersión cadena arriba (diseminación pagetoide). Muchos de los melanomas CNDS son los melanomas de extensión superficial.

40 El daño crónico inducido por el sol se define como el que tiene una puntuación mayor de CSD que CSD 2. Las puntuaciones se obtienen mediante la determinación del grado de elastosis solar en secciones teñidas de hematoxilina y eosina (H & E) de la piel normal que rodea los melanomas a un aumento de 100-200x utilizando el siguiente sistema (Landi et al., Science 2006), ejemplos de los cuales se proporcionan en la figura 1:

CDS 0: ausencia de fibras elastóticas; CDS 0+: fibras elastóticas raras discernible sólo a un aumento 200x

45 CDS 1: fibras elastóticas dispersadas que se extienden como unidades individuales, no como fanegas, entre los haces de colágeno; los clasificadores "-" o "+" se utilizan para indicar si las fibras elastóticas fueron muy escasas o estaban densamente dispersas.

CDS 2: fibras elastóticas densamente dispersadas distribuidas predominantemente como fanegas en lugar de unidades individuales; el clasificador "-" se utiliza para indicar qué fanegas estaban presentes, pero las fibras elastóticas distribuidas como unidades individuales predominaban; se utilizó el clasificador "+" cuando se formaron
50 agregados más grandes de fanegas, pero conservando el contorno de fanegas individuales en lugar de la formación de depósitos amorfos;

CDS 3: depósitos de material amorfo de color gris azulado con pérdida de la textura de la fibra; el clasificador "-" solo es para la formación focal de depósitos amorfos; el clasificador "+" es para aglomerados muy grandes de material
55 basófilo difuso.

Todas las imágenes de la figura 1 fueron tomadas con el objetivo de 40x a excepción de la parte inferior derecha, que muestra una vista general con el objetivo 10x.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "determinar que el melanoma surgió de" un sitio, por ejemplo, la piel acral, mucosa, la conjuntiva, o la piel que tiene daño crónico inducido por el sol, se refiere a la identificación del sitio de origen de un melanoma. Tal determinación puede ser realizada por inspección visual de un paciente o por la evaluación de la patología del melanoma.

5 Los términos "tumor" o "cáncer" en un animal se refieren a la presencia de células que poseen características tales como el crecimiento atípica o la morfología, incluyendo la proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, rápido crecimiento y velocidad de proliferación y ciertas características morfológicas distintivas. A menudo, las células cancerosas estarán en forma de tumor, pero dichas células pueden existir solas en un animal. "Tumor" incluye tanto los tumores benignos como los malignos. El término "neoplásico" se refiere a un crecimiento atípico tanto benigno como maligno.

10 "Muestra biológica", como se utiliza en este documento, se refiere a una muestra obtenida de un paciente sospechoso de tener o que tiene un melanoma. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una biopsia de tejido, la cual se refiere a cualquier tipo de biopsia, tal como una biopsia con aguja, biopsia con aguja fina, biopsia quirúrgica, etc. La muestra comprende típicamente una muestra de tejido de la piel que alberga la lesión o la sospecha de la lesión, aunque la muestra biológica también se puede derivar de otra, de otro sitio, por ejemplo, un sitio para que un melanoma pueda hacer metástasis, o de la sangre. En algunos casos, la muestra biológica puede provenir también de una región adyacente a la lesión o que se sospeche con lesión.

15 "Proporcionar una muestra biológica" significa obtener una muestra biológica para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Más a menudo, esto se realizará mediante la eliminación de una muestra de células de un paciente, pero también se puede lograr mediante el uso de células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas de otra persona, en otro momento, y/o para otro fin), o mediante la realización de los métodos in vivo. También se pueden utilizar tejidos de almacenamiento, que tengan tratamiento o una historia con resultados.

20 Un paciente que es "un candidato para recibir una terapia basada en la tirosina quinasa receptora" se refiere a un paciente que tiene un melanoma que tiene un defecto en c-KIT, de manera que el c-KIT está aumentado en el número de copias, se sobreexpresa y/o tiene una mutación de la secuencia; o un paciente que tiene una mutación de secuencia, ya sea sola o en combinación con un defecto de c-KIT, en SHP-2, por ejemplo, en el dominio de proteína tirosina fosfatasa de SHP-2.

25 Una "terapia a base de quinasa tirosina receptora" se refiere a un agente que inhibe la c-KIT, incluyendo agentes de moléculas pequeñas, tales como mesilato de imatinib, dasatinib o sunitinib, o análogos de los mismos, anticuerpos y similares.

30 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente 60% de identidad, preferiblemente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior identidad sobre una región especificada, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada) según se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto descritos más abajo, o mediante el alineamiento manual y la inspección visual (véase, por ejemplo, el sitio web NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o similares). Tales secuencias entonces se dice que son "sustancialmente idénticas." Esta definición también se refiere, o se puede aplicar, al complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones, así como variantes de origen natural, por ejemplo, polimórficas o alélicas y variantes artificiales. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden dar cuenta de los huecos y similares. Preferiblemente, existe identidad en una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que tiene 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

35 Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la cual las secuencias de ensayo se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, las coordenadas de subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de la secuencia. Preferiblemente, se pueden utilizar los parámetros del programa por defecto o pueden ser designados parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces las identidades de secuencia por ciento para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

40 Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de uno del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste típicamente de 20 a 600, por lo general aproximadamente de 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente de 100 a aproximadamente 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para su comparación son muy conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de

Smith & Waterman, *Adv. Appl. Mat.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), O mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 suplemento)).

Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nucl. Acids Res.* 25: 3.389 a 3402 (1977) y Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). Para los fines de esta invención, BLAST y BLAST 2.0 se utilizan con los parámetros por defecto para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la descripción. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., *Supra*). Estas coincidencias de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por lo que la puntuación de alineamiento acumulativa se puede aumentar. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, por ejemplo, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de puntuación negativa; o el final de cualquier secuencia que se alcanza. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un punto de corte de 100, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos (proteínas), el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915)). El algoritmo BLAST2.0 se utiliza con los parámetros por defecto y el filtro apagado.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la suma de la probabilidad más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001. Los valores log pueden ser números negativos grandes, por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 40, 70, 90, 110, 150, 170, etc.

Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Sin embargo, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden usarse para amplificar las secuencias.

Los términos "aislado", "purificado" o la expresión "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan como se encuentran en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación se purifica sustancialmente. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de algunos marcos de lectura abiertos que flanquean naturalmente al gen y codifican distintas proteínas de la proteína codificada por el gen. El término "purificado" en algunas realizaciones indica que un ácido nucleico o una proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. Preferiblemente, esto significa que el ácido nucleico o la proteína es al menos 85% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, y lo más preferiblemente al menos 99% puro. "Purificar" o "purificación" en otras realizaciones significa la eliminación de al menos un contaminante de la composición a purificar. En este sentido, la purificación no requiere que el compuesto purificado sea homogéneo, por ejemplo, 100% de pureza.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de origen natural de aminoácidos, aquellos que contienen restos modificados, y polímeros de aminoácido de origen no natural.

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

Los aminoácidos pueden ser referidos en la presente memoria por cualquiera de sus comúnmente conocidos símbolos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, pueden hacer referencia a sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

"Variantes conservativamente modificadas" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias particulares de los ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas, por ejemplo, naturalmente contiguas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican al aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede ser alterado a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Cualquier experto reconocerá que en ciertos contextos cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, a menudo las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda reales.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, cualquier experto reconocerá que las sustituciones individuales, deleciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína, que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la codificada secuencia, es una "variante modificada de forma conservadora", cuando la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora se suman y no excluyen a las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la descripción. Típicamente, las sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

"Ácido nucleico" u "oligonucleótido" u "polinucleótido" o equivalentes gramaticales usados en este documento significan al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Los oligonucleótidos son típicamente de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50 o más nucleótidos de longitud, hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos y polinucleótidos son unos polímeros de cualquier longitud, incluyendo longitudes más largas, por ejemplo, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10000, etc. Un ácido nucleico contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, los análogos de ácido nucleico que se incluyen pueden tener estructuras, que comprenden, por ejemplo, fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato o enlaces O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press); y estructuras de ácidos nucleicos peptídicas y los enlaces. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con estructuras positivas; estructuras no iónicas y estructuras de no ribosa, incluyendo las descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 5.235.033 y 5.034.506, y en los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Sanghui & Cook, eds. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de una definición de ácidos nucleicos. Las modificaciones de la estructura de ribosa-fosfato se pueden hacer por una variedad de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y la vida media de tales moléculas en entornos fisiológicos o como sondas en un biochip.

Pueden hacerse mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos; alternatively, se pueden realizar mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos y mezclas de ácidos nucleicos y análogos de origen natural.

Una variedad de referencias describe tales análogos de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, fosforamidato (Beaucage et al, Tetrahedron 49 (10): 1925 (1993) y referencias en el mismo; Letsinger, J. Org. Chem. 35: 3800 (1970); Sprinzl et al., Eur. J. Biochem. 81: 579 (1977); Letsinger et al., Nucl. Acids Res. 14: 3487 (1986); Sawai et al, Chem. Lett. 805 (1984), Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); y Pauwels et al, Chemica Scripta 26: 141 91986)), fosforotioato (Mag et al, Nucleic Acids Res. 19: 1437 (1991); y la Patente de EE.UU. No. 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al, J. Am. Chem. Soc. 111: 2321 (1989), los enlaces O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press), y las estructuras de ácidos nucleicos peptídicas y los enlaces (véase Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114: 1895 (1992); Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008 (1992); Nielsen, Nature, 365: 566 (1993); Carlsson et al, Nature 380: 207 (1996).

Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con estructuras positivas (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097 (1995); estructuras no iónicas (patentes de EE.UU. Nos. 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowshi et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30: 423 (1991); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); Letsinger et al, Nucleoside and Nucleotide 13: 1597 (1994); capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395 (1994); Jeffs et al, J. Biomolecular NMR 34:17 (1994); Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996)) y estructuras de no ribosa, incluyendo las descritas en las patentes de EE.UU. Nos. 5.235.033 y 5.034.506, y en los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de una definición de ácidos nucleicos (ver Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. (1995) pp 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls, C & E News Jun. 2, 1997, página 35.

Otros análogos incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNA), que son análogos de ácidos nucleicos peptídicos. Estas estructuras son sustancialmente no iónicas en condiciones neutras, en contraste con la estructura de fosfodiéster altamente cargada de los ácidos nucleicos naturales. Esto da como resultado dos ventajas. En primer lugar, la estructura ANP muestra una mejor cinética de hibridación. Los PNA tienen grandes cambios en la temperatura de fusión (T_m) para las pares de bases no coincidentes frente a las perfectamente emparejadas. El ADN y el ARN presentan típicamente una caída de 2-4°C en la T_m para un desapareamiento interno. Con la estructura de PNA no iónica, la caída está más cerca de 7-9°C. De manera similar, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas estructuras es relativamente insensible a la concentración de sal. Además, los PNA no son degradados por enzimas celulares y por lo tanto pueden ser más estables.

Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble, tal como se especifica, o contener porciones tanto de secuencia de doble cadena como de cadena sencilla. Como se apreciará por los expertos en la materia, la representación de una sola hebra también define la secuencia de la cadena complementaria; por lo tanto las secuencias descritas en el presente documento también proporcionan el complemento de la secuencia. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular abarca también implícitamente sus variantes modificadas de manera conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. "Transcripto" se refiere típicamente a un ARN de origen natural, por ejemplo, un pre-ARNm, ARNnh o ARNm. Tal como se utiliza en este documento, el término "nucleósido" incluye nucleótidos y nucleósidos y nucleótidos análogos, y nucleósidos modificados tales como nucleósidos modificados aminoácidos. Además, "nucleósido" incluye estructuras analógicas no naturales. Por lo tanto, por ejemplo, las unidades individuales de un ácido nucleico peptídico, cada una conteniendo una base, se denominan en este documento como un nucleósido.

Un "marcador" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ^{32}P , colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas u otras entidades que pueden hacerse detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de un radiomarcador en el péptido o usarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido. Los marcadores se pueden incorporar en los ácidos nucleicos de KIT, proteínas y anticuerpos en cualquier posición. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al marcador, por ejemplo, usando métodos descritos en Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego.

Una "sonda marcada de ácido nucleico u oligonucleótido" es uno que se une, ya sea de forma covalente, a través de un enlazador o un enlace químico, o no covalentemente, van der Waals, electrostático, enlaces iónicos, o de hidrógeno a un marcador de tal manera que la presencia de la sonda se puede detectar detectando la presencia del marcador unido a la sonda. Alternativamente, el método de uso de las interacciones de alta afinidad puede lograr los mismos resultados en los que uno de un par de parejas de unión se une a la otra, por ejemplo, biotina, estreptavidina.

Tal como se usa en el presente documento una "sonda de ácido nucleico u oligonucleótido" se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente a través del apareamiento de bases complementarias, normalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. En la presente memoria, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden estar unidas por un enlace distinto de un enlace fosfodiéster, con tal de que no interfiera funcionalmente con la hibridación. Por lo tanto, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes están unidas por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster. Se entenderá por cualquier experto en la técnica que las sondas puedan unir secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas están preferiblemente marcadas directamente como con isótopos, cromóforos, luminóforos, cromógenos, o marcarse indirectamente tal como con biotina a la que un complejo de estreptavidina puede unirse más tarde. Por ensayar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada. El diagnóstico o pronóstico se pueden basar en el nivel genómico, o en el nivel de ARN o la expresión de proteínas.

El término "recombinante", cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o un ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico nativo o proteína, o que la célula deriva de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otra forma, expresados o no expresados en absoluto. Por la expresión "ácido nucleico recombinante" en el presente documento se quiere decir el ácido nucleico, formado originalmente *in vitro*, en general, mediante la manipulación del ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. Del mismo modo, una "proteína recombinante" es una proteína producida usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente.

La expresión "selectivamente (o específicamente) se hibrida a" se refiere a la unión, la formación de dúplex o la hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total o de la biblioteca).

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente de 5 a 10°C inferior al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica determinada, pH, y concentración de ácido nucleico) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,0 M de ión sodio, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayor que 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la del fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares pueden ser de la siguiente manera: 50% de formamida, 5 x SSC y SDS al 1%, incubando a 42°C, o, 5 x SSC, 1% de SDS, incubando a 65°C, con el lavado en 0,2 x SSC, y 0,1% de SDS a 65°C. Para la PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para la amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32°C y 48°C, dependiendo de la longitud del cebador. Por amplificación por PCR de alta rigurosidad, una temperatura de aproximadamente 62°C es típica, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden variar de aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C, dependiendo de la longitud del cebador y la especificidad. Las condiciones de ciclo típico para ambas amplificaciones de alta y de baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90°C-95°C durante 30 seg-2 min, con una duración de la fase de hibridación 30 sec-2 min, y una fase de extensión de aproximadamente 72°C durante 1-2 min. Se proporcionan protocolos y directrices para las reacciones de amplificación de baja y alta rigurosidad, por ejemplo, en Innis et al. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. Nueva York).

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas son todavía sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codón permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos típicamente se hibridan en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Las "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%,

NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 1 x SSC a 45°C. Una hibridación positiva es al menos dos veces la del fondo. Los expertos reconocerán fácilmente que las condiciones de hibridación y lavado alternativas se pueden utilizar para proporcionar condiciones de rigurosidad similares. Las directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación se proporcionan en numerosas referencias, por ejemplo, y Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al.

La expresión "efectos funcionales" en el contexto de ensayos para probar los compuestos que inhiben la actividad de una proteína c-KIT incluye la determinación de un parámetro que está indirecta o directamente bajo la influencia de la proteína del cáncer de c-KIT o el ácido nucleico, por ejemplo, un efecto funcional, físico o químico, tal como la capacidad de disminuir la tumorigénesis. Las actividades o el efecto funcional de c-KIT incluyen la actividad de la interacción proteína-proteína, por ejemplo, la capacidad de c-KIT para unirse a un anticuerpo u otra proteína con la que interactúa; la actividad de tirosina quinasa receptora, la capacidad de c-KIT para unirse a un ligando, el crecimiento celular en agar blando; la dependencia del anclaje; la inhibición por contacto y la limitación de la densidad del crecimiento; la proliferación celular; la transformación celular; el factor de crecimiento o la dependencia en suero; los índices de marcadores tumorales específicos; la invasividad en Matrigel; el crecimiento del tumor y la metástasis in vivo, incluyendo la medición del crecimiento del tumor y la "toma" del tumor en un sistema modelo; ARNm y la expresión de proteínas en las células, incluyendo las sometidas a metástasis y otras características de las células cancerosas. Los "efectos funcionales" incluyen actividades in vitro, in vivo y ex vivo.

"Inhibidores" de c-KIT se refieren a moléculas inhibitoras o compuestos que, por ejemplo, se unen, parcial o totalmente a la actividad de bloque, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o desregulan la actividad o la expresión de las proteínas c-KIT, por ejemplo, los antagonistas. Los inhibidores incluyen siARN o ARN antisentido, versiones genéticamente modificadas de proteínas c-KIT, por ejemplo, versiones con actividad alterada, así como los antagonistas de KIT de origen natural y sintéticos, anticuerpos, moléculas químicas pequeñas y similares. Los inhibidores son conocidos, se pueden realizar otros ensayos para la identificación de inhibidores in vitro o in vivo, por ejemplo, en células o membranas celulares, mediante la aplicación de compuestos inhibidores de ensayo, y luego determinando los efectos funcionales sobre la actividad.

Las muestras o los ensayos que comprenden proteínas c-KIT que se tratan con un inhibidor potencial se comparan con muestras control sin el inhibidor, para examinar el grado de inhibición. A las muestras control (no tratadas con inhibidores) se les asigna un valor de actividad de la proteína relativa del 100%. La inhibición de c-KIT se logra cuando el valor de actividad con respecto al control es de aproximadamente 80%, preferiblemente 50%, más preferiblemente desde 25 hasta 0%.

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

En la presente memoria, "anticuerpo" incluye la referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. El término también incluye formas de ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). El término "anticuerpo" también incluye formas de unión de antígeno a anticuerpos, incluyendo fragmentos con capacidad de unión al antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG. Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-95 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Véase también, por ejemplo, Kuby, J., Immunology, 3ª ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también se refiere a fragmentos Fv de cadena individual recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Se describen moléculas bivalentes y biespecíficas en, por ejemplo, Kostelny et al. (1992) J Immunol 148: 1547, Pack and Pluckthun (1992) Biochemistry 31: 1579, Hollinger et al, 1993, supra, Gruber et al. (1994) J Immunol: 5368, Zhu et al. (1997) Protein Sci 6: 781, Hu et al. (1996) Cancer Res. 56: 3055, Adams et al. (1993) Cancer Res. 53: 4026, y McCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8: 301.

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

Típicamente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como "dominios"). Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen cuatro regiones "marco" interrumpidas por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". La extensión de las regiones estructurales y CDR se han definido. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas

se conservan relativamente dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, que es las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyente, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

5 Las CDR son principalmente responsables de la unión de un antígeno a un epítipo. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente partiendo del extremo N-terminal y también se identifican típicamente por la cadena en la que se encuentra la CDR en particular. Así, una CDR3 de V_H se encuentra en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

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

15 La expresión "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a un anticuerpo en el que se han unido los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas para formar una cadena. Típicamente, se inserta un péptido de enlace entre las dos cadenas para permitir el plegamiento apropiado y la creación de un sitio de unión activo.

20 Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de inmunoglobulina en la que (a) se altera, se sustituye o se intercambia la región constante, o una porción de la misma, para que el sitio de unión al antígeno (región variable) se una a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especies, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, un factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) se altera, se sustituye o se intercambia la región variable, o una porción de la misma con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

25 Un "anticuerpo humanizado" es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, una rata o un conejo que tienen la deseada especificidad, afinidad y capacidad. En algunos casos, los restos marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentren ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente toda regiones marco (FR) son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)). La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al, Science 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de las CDR de roedor o secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N°. 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

45 La expresión "anticuerpo completamente humano" se refiere a una inmunoglobulina que comprende regiones variables humanas además de regiones marco y constantes humanas. Tales anticuerpos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los métodos *in vitro* implican el uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpos humanos que se muestran en bacteriófagos (por ejemplo, McCafferty et al, 1990, Nature 348: 552-554; Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); y Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991)), células de levadura (Boder y Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15: 553-557) o en ribosomas (Hanes y Pluckthun, 1997, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 94: 4937-4942). De manera similar, se pueden preparar anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja bastante a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento del gen, ensamblaje y repertorio de anticuerpos.

55 Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 6.150.584, 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: (por ejemplo, Jakobavits, Adv Drug Deliv Rev. 31: 33-42 (1998), Marks et al, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild et al, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

"Epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por

plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan bajo la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítomo incluye normalmente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 ó 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

5 Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocolos in Methods in Molecular Biology, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Métodos generales recombinantes

Esta invención se basa en técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante para la preparación de c-Kit para su uso en la invención y para métodos de detección de c-Kit. Textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook & Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª Ed, 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994-1999). Por ejemplo, en aplicaciones en las que c-KIT, o un fragmento de c-KIT se vaya a producir, por ejemplo, para su uso en un ensayo para detectar inhibidores, se emplean protocolos de expresión de rutina.

Identificación de c-Kit o SHP2 secuencias en una muestra de un paciente

En un aspecto, la presencia de niveles elevados del polinucleótido c-KIT, por ejemplo, ARNm, o el aumento de los niveles de proteína c-KIT y/o la presencia de mutaciones en la secuencia de c-KIT o SHP2 se determina en muestras biológicas sospechosas de que comprendan células de melanoma.

20 En algunas realizaciones, se determinan las mutaciones en c-KIT. Como se ha señalado, las secuencias KIT humanas son muy conocidas. Además del ARNm y las secuencias de proteínas (números de entrada a modo de ejemplo, supra). La secuencia genómica es conocida (véase, por ejemplo, Vandenberg, Oncogene 1992 julio; 7 (7): 1259-1266). Las variantes polimórficas se sabe también que no influyen en la actividad, incluyendo polimorfismos de nucleótido único en el intrón, regiones no traducidas y en la secuencia de codificación que resulta en ningún cambio en la secuencia de aminoácidos o en un cambio conservador (véase, por ejemplo, la base de datos NCBI SNP). El gen abarca 89 kb y tiene 21 exones. La transcripción del ARNm es 5,23 kb. El empalme alternativo del exón 9 da lugar a dos isoformas, KitA y Kit, que se diferencian en la presencia o ausencia de cuatro aminoácidos.

"Mutación de secuencia", como se usa en esta solicitud, se refiere a los cambios en una secuencia de polinucleótidos que dan lugar a cambios en la actividad de la proteína. Las mutaciones pueden ser sustituciones de nucleótidos, tales como las sustituciones de un solo nucleótido, inserciones o deleciones. Las mutaciones c-KIT detectadas en melanomas acral, mucosal, CSD u ocular en la presente invención son típicamente activadoras de mutaciones que conducen a la activación de la actividad c-KIT.

La proteína KIT de longitud completa tiene 976 aminoácidos de longitud y contiene varios dominios característicos de esta familia de receptores de factores de crecimiento, incluyendo 5 dominios del tipo C2 similares a inmunoglobulina de la región extracelular, tres de los cuales están involucrados en la unión del ligando. La unión del ligando a c-KIT conduce a su homodimerización y a la activación de su actividad enzimática de tirosina quinasa intracelular intrínseca, con autofosforilación posterior. La región intracelular de c-Kit contiene dos dominios de tirosina quinasa, los TK I y TK II, así como un dominio yuxtamembrana que regula negativamente los dominios TK I y TK II y un dominio de proteína tirosina quinasa. La estructura de la quinasa c-kit activa ha sido determinada (véase, por ejemplo, Mol et al., J Biol Chem 2003 agosto 22; 278 (34): 31461-64). Son conocidas la pérdida de función y la ganancia de mutaciones funcionales.

Varias mutaciones de ganancia de función se han identificado en tumores malignos, que dan como resultado, la activación constitutiva SCF-independiente de c-Kit. La actividad de la tirosina quinasa de KIT se puede activar por mutaciones de varios exones diferentes del gen c-kit (véase, por ejemplo, la revisión de Heinrich et al., supra). Los exones 1-9 abarcan los dominios extracelulares y los exones 11-17 codifican los dominios intracelulares. El exón 10 codifica el dominio transmembrana, el exón 11 codifica el dominio yuxtamembrana intracelular, y los exones 13 y 17 son los dominios de tirosina quinasa. Se han descrito mutaciones en el exón 2 de la porción extracelular en los trastornos mieloproliferativos, se han identificado mutaciones en el exón 8 en la leucemia mieloide aguda y en el exón 9 en tumores del estroma gastrointestinal. Se han descrito mutaciones en el exón 11, que es el dominio yuxtamembrana de c-Kit que regula negativamente los dominios de tirosina quinasa de los exones 13 y 17, en tumores del estroma gastrointestinal humanos. Este es el sitio más común de mutación en los tumores del estroma gastrointestinal humano. Las mutaciones en los exones 13 y 17, que codifican para los dominios de tirosina quinasa de c-Kit, se detectan con frecuencia en la mastocitosis sistémica, leucemias de unión al factor de núcleo y los seminomas. Las mutaciones en los dominios de tirosina quinasa afectan a la capacidad de unión a ATP de c-Kit, y pueden producir ganancia de función de la actividad de tirosina quinasa o la pérdida de función. Las mutaciones en el clúster de la región yuxtamembrana de c-Kit alrededor de los dos sitios de autofosforilación principales median la unión de PTB, Tyr-568 y Tyr-570 y están asociados con tumores del estroma gastrointestinal humanos. Las mutaciones en el dominio quinasa se encuentran en los mastocitos y en leucemias mieloides y en los tumores de células germinales humanos.

La presente descripción se basa en el descubrimiento de mutaciones en sitios de mutaciones de c-KIT comunes en melanomas, por ejemplo, en melanomas de la mucosa, acral y CD. Una mutación puede estar en cualquier parte del gen de c-KIT. Los sitios de mutaciones de la secuencia comunes están presentes en los exones 11, 13, 17 y 18. Las mutaciones ejemplares que pueden ser identificadas en la presente invención se muestran en la Tabla 3. Estas mutaciones incluyen las mutaciones siguientes: K642E, L576P, D816H, V559A, A829P y la eliminación intrónica, R634W, Y553N y N566D. Como se ha indicado en la Tabla 3, algunas de estas mutaciones no se han publicado anteriormente. Tal como se entiende en la técnica, la mutación particular comúnmente se conoce por el cambio en la secuencia de aminoácidos que resulta de la mutación en la secuencia de ácido nucleico.

La sobreexpresión y/o la mutación de secuencia en C-KIT son detectadas para el diagnóstico (o para indicaciones de pronóstico) de melanomas, por ejemplo, para el diagnóstico de subtipos de melanomas, tales como, acral, mucosal, CDS y melanomas oculares. Por lo tanto, pueden ser analizadas muestras biológicas obtenidas de pacientes que tienen o se sospecha que tienen melanoma respecto a los aumentos en el número de copias C-KIT, la sobreexpresión de ARNm de c-KIT, la sobreexpresión de la proteína C-KIT y por la presencia de mutaciones en C-KIT. La presencia de mutaciones está convenientemente analizada mediante el análisis de muestras de ácido nucleico, ARN o ADN, de la muestra biológica, pero también se puede determinar mediante el análisis de proteínas.

Mutaciones de secuencia SHP2

El SHP2 (también conocido como PTPN11) codifica la proteína tirosina fosfatasa tipo no receptor, región de homología de Src 2-dominio fosfatasa-2 (SHP-2) y funciona como un transductor de señal intracelular que se asocia con los receptores de tirosina quinasa y los adaptadores de armazón (Tartaglia y Gelb, *Ann. Rev. Genom. and Hum. Gen.* 6: 45-68, 2005). El ácido nucleico y la proteína a partir de células de melanoma, por ejemplo, células de melanoma acral, mucosal, ocular, o melanomas CSD, de un paciente también pueden ser evaluadas respecto a la presencia de mutaciones de secuencia SHP2. Típicamente, el método comprende detectar una mutación en el dominio de la proteína tirosina fosfatasa, por ejemplo, un P491L, un S150F, o una sustitución 1309V. La detección de la secuencia mutante se realiza típicamente mediante la evaluación de muestras de ácidos nucleicos a partir de células de melanoma del paciente. La evaluación se puede realizar utilizando métodos muy conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, análisis de la secuencia, uso de oligonucleótidos específicos de alelo y similares. Los métodos empleados son los mismos que los utilizados para determinar las mutaciones en la secuencia de c-KIT.

Las mutaciones en SHP2 también se pueden determinar mediante la evaluación de muestras de proteínas, por ejemplo, usando anticuerpos específicos.

Detección del número de copias

En una realización, la detección diagnóstica y pronóstica de c-Kit en el cáncer se lleva a cabo mediante la determinación del número de copias de c-Kit, es decir, el número de secuencias de ADN en una célula que codifica c-Kit. Los métodos para evaluar el número de copias de un gen particular son muy conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, entre otros, ensayos de hibridación y de amplificación. Un aumento en el número de copias de c-KIT se determina usando una sonda que se hibrida selectivamente con c-KIT.

En algunas realizaciones, el número de copias de c-Kit en una muestra se determina mediante hibridación in situ, por ejemplo, hibridación in situ fluorescente o FISH. Los ensayos de hibridación in situ son muy conocidos (por ejemplo, Angerer (1987) *Meth. Enzymol* 152: 649). Las sondas utilizadas en dichas aplicaciones se hibridan específicamente a c-KIT. Las sondas se marcan, típicamente con marcadores fluorescentes. Las sondas preferidas son suficientemente largas, por ejemplo, de aproximadamente 50, 100 ó 200 nucleótidos a aproximadamente 1.000 o más nucleótidos, con el fin de hibridar específicamente con el ácido o ácidos nucleicos diana en condiciones rigurosas.

Cualquiera de un número de otros ensayos basados en la hibridación se puede utilizar para detectar el número de copias de c-kit en las células de una muestra biológica. Por ejemplo, hibridación en manchas, ensayos basados en matrices y similares se pueden utilizar para determinar el número de copias de c-Kit.

En otra realización, los ensayos basados en la amplificación se utilizan para medir el número de copias de c-kit y se pueden determinar los niveles de transcritos de c-kit. En tal ensayo, las secuencias de ácido nucleico de c-Kit actúan como una plantilla en una reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa o PCR). Tales reacciones de amplificaciones se realizan cuantitativamente. En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación será proporcional a la cantidad de plantilla en la muestra original. La comparación con los controles apropiados proporciona una medida del número de copias o del nivel de transcripción de ARN. Los métodos de amplificación cuantitativa son muy conocidos por los expertos en la técnica. Los protocolos detallados para la PCR cuantitativa de las muestras de ADN y ARN son conocidos (véase, por ejemplo, Innis et al. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. Nueva York). Las conocidas secuencias de ácidos nucleicos para c-KIT (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 1) son suficientes para permitir a que un experto seleccione rutinariamente cebadores para amplificar cualquier parte del gen. Los cebadores adecuados para la amplificación de secuencias específicas pueden ser diseñados utilizando los principios bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dieffenbach y Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (1995)).

5 Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, Wu y Wallace (1989) *Genomics* 4: 560, Landegren et al (1988) *Science* 241: 1077 y Barringer et al. (1990) *Gen* 89: 117), la amplificación por transcripción (Kwoh et al (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173), la replicación de secuencias autosostenidas (Guatelli et al (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874), PCR de punto, y PCR por el adaptador del enlazante, etc.

10 La presencia de mutaciones en secuencias de ADN o ARN de c-KIT se puede determinar usando cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, en una realización, puede ser utilizada la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo, que se basa en distinguir un mutante de una secuencia de ácidos nucleicos normal usando un oligonucleótido que se hibrida específicamente con la secuencia de ácido nucleico mutante o normal. Este método emplea típicamente oligonucleótidos cortos, por ejemplo, 15-20 nucleótidos, de longitud, que están diseñados para hibridar diferencialmente al alelo normal o al mutante. Guías para el diseño de tales sondas están disponibles en la técnica. La presencia de un alelo mutante se determina mediante la determinación de la cantidad de oligonucleótido específico de alelo que se hibrida a la muestra.

15 Son conocidos en la técnica formatos de ensayo adecuados para la detección de híbridos formados entre las sondas y las secuencias de ácidos nucleicos en una muestra e incluyen el formato de la diana inmovilizada (hibridación en manchas) y formatos de ensayo de la sonda inmovilizada (hibridación en manchas inversa o hibridación en línea). Los formatos de ensayo hibridación en manchas e hibridación en manchas inversa se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 5.310.893; 5.451.512; 5.468.613; y 5.604.099.

Cebadores específicos de alelo

20 En otras realizaciones, la presencia (o la cantidad) de un ácido nucleico c-KIT normal o mutante se puede detectar usando amplificación específica de alelo o métodos de extensión de cebadores. Estas reacciones implican típicamente el uso de cebadores que están diseñados para dirigir específicamente un alelo normal o mutante a través de una falta de coincidencia en el extremo 3' de un cebador. La presencia de una falta de coincidencia afecta a la capacidad de la polimerasa para extender un cebador cuando la polimerasa carece de actividad de corrección de errores. La cantidad de producto amplificado puede determinarse utilizando una sonda o midiendo directamente la cantidad de ADN presente en la reacción.

25 La detección de niveles elevados de ácidos nucleicos c-KIT o la presencia de una mutación c-KIT también se puede realizar utilizando la actividad de la nucleasa 5' (también conocido como el ensayo de "TaqMan®"), por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5.210.015; 5.487.972; y 5.804.375; y Holland et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280. En tal ensayo, se añaden sondas de detección marcadas que se hibridan dentro de la región amplificada durante la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, la sonda de hibridación puede ser una sonda específica de alelo que discrimine a un alelo normal o mutante. Alternativamente, el método puede llevarse a cabo utilizando un cebador específico de alelo y una sonda marcada que se una al producto amplificado. En otras realizaciones, la sonda no puede discriminar entre un alelo mutante y uno normal.

35 En otras realizaciones, la presencia de un alelo c-KIT mutante puede ser determinada de forma conveniente utilizando secuenciación del ADN, tal como pirosecuenciación u otras técnicas de secuenciación conocidas. Otros métodos de detección incluyen métodos de detección de polimorfismo conformacional de cadena sencilla y análisis de electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización.

40 Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, se detectan niveles de ARN de c-KIT. Los métodos de detección y/o cuantificación del nivel de transcritos del gen de c-Kit (ARNm o ADNc hecho a partir de estos) utilizando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los niveles de expresión de c-Kit también se pueden analizar mediante técnicas tales como la transferencia de puntos, hibridación in situ, protección de RNasa, sistemas de microchips de ADN de sondeo y similares.

45 El nivel de transcritos de c-KIT o la presencia de una mutación en el transcrito se puede detectar también por métodos basados en la amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Los métodos RT-PCR son muy conocidos por los expertos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., supra). Preferiblemente, en la RT-PCR cuantitativa, por ejemplo, se utiliza un ensayo TaqMan®, lo que permite la comparación del nivel de mRNA en una muestra con una muestra control o valor.

Detección de secuencias del polipéptido c-Kit

50 La expresión o la actividad del c-Kit alterada también se pueden detectar mediante la detección de los niveles de proteína o de la actividad de c-Kit. Por ejemplo, la detección de la actividad de la proteína c-Kit o la expresión se puede utilizar con fines diagnósticos o en ensayos de selección. En algunas realizaciones, el nivel de c-Kit se determina convenientemente usando ensayos inmunológicos para detectar el nivel de polipéptidos de c-kit. La siguiente sección trata sobre la detección inmunológica de c-kit. La sección también se refiere a la generación y la ingeniería de anticuerpos que se pueden utilizar, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas.

Detección inmunológica de c-Kit

Los anticuerpos pueden usarse para detectar c-Kit o se pueden evaluar en los métodos de la invención para la capacidad de inhibir c-Kit. Se puede detectar y/o cuantificar c-Kit usando cualquiera de un número de ensayos de unión inmunológicos bien reconocidos. Una visión general de la tecnología aplicable puede encontrarse en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) y Harlow y Lane, *Using Antibodies* (1999). Otros recursos incluyen también en *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites y Terr, eds., 7ª ed., 1991, y *Current Protocols in Immunology* (Coligan, et al. Eds, John C. Wiley, 1999-hasta el presente). Los ensayos de unión inmunológicos pueden utilizar anticuerpos policlonales o monoclonales. En algunas realizaciones, se pueden emplear anticuerpos que detectan específicamente moléculas mutantes c-KIT.

Ensayos utilizados comúnmente incluyen ensayos no competitivos, por ejemplo, ensayos de sándwich y ensayos competitivos. En ensayos competitivos, la cantidad de c-Kit presente en la muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de un c-Kit conocido, añadido (exógeno) desplazado (competido a distancia) de un anticuerpo anti-c-Kit por el desconocido c-Kit presente en una muestra. Otros formatos de ensayo usados comúnmente incluyen inmunotransferencias, que se utilizan para detectar y cuantificar la presencia de proteínas en una muestra. Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que utilizan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados, que son detectados a continuación de acuerdo con técnicas estándar (véase Monroe et al., *Amer. Clin. Prod. Rev.* 5: 34-41 (1986)).

Los inmunoensayos también utilizan a menudo un agente marcador para unirse específicamente y marcar el complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente marcador puede ser en sí mismo uno de los restos que comprenden el complejo anticuerpo/antígeno. Por lo tanto, el agente marcador puede ser un polipéptido c-Kit marcado o un anticuerpo anti-c-Kit marcado. Alternativamente, el agente marcador puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo secundario, que se une específicamente al complejo anticuerpo/antígeno (un anticuerpo secundario es típicamente específico para los anticuerpos de la especie de la que se deriva el primer anticuerpo). Otras proteínas capaces de unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulina, tales como la proteína A o la proteína G también se pueden usar como el agente de marcado. El agente marcador puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, a la que otra molécula se puede unir específicamente, tal como estreptavidina. La variedad de restos detectables son muy conocidos para los expertos en la técnica.

El marcador particular o grupo detectable usado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, con tal de que no interfiera significativamente con la unión del anticuerpo utilizado en el ensayo específico. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Tales marcadores detectables se han desarrollado mucho en el campo de los inmunoensayos y, en general, la mayoría de cualquier marcador útil en tales métodos puede aplicarse a la presente invención. Por lo tanto, una marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), compuestos fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, fluoresceína y similares), radiomarcadores, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras utilizadas comúnmente en un ELISA), estreptavidina/biotina y marcadores colorimétricos tales como el oro coloidal o el vidrio coloreado o las perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

Se pueden usar también compuestos quimioluminiscentes. Para una revisión de diversos sistemas de marcaje o de producción de señal que se pueden usar, véase la patente de EE.UU. N° 4.391.904.

Hay anticuerpos para c-kit disponibles comercialmente. En algunas realizaciones, las mutaciones de c-Kit se pueden detectar usando anticuerpos que se unen específicamente a una forma mutante, así también se pueden utilizar inmunoensayos para detectar las proteínas c-Kit mutantes.

El c-Kit o un fragmento del mismo, por ejemplo, el dominio extracelular, o el dominio de yuxtaposición, se pueden utilizar para producir anticuerpos específicamente reactivos con c-Kit. Por ejemplo, se aísla un c-Kit recombinante o un fragmento antigénico del mismo. La proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Alternativamente, puede ser utilizado un péptido sintético derivado de las secuencias descritas en este documento y conjugado a una proteína vehículo como inmunógeno. También se pueden utilizar proteínas de origen natural, ya sea en forma pura o impura. El producto se utiliza a continuación para generar anticuerpos.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con c-KIT son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Coligan; Harlow y Lane, ambos supra). Dichas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse et al, *Science* 246: 1275-1281 (1989); Ward et al, *Nature* 341: 544-546 (1989)). Tales anticuerpos pueden ser utilizados para aplicaciones diagnósticas o pronósticas, por ejemplo, en la detección de melanomas o de otros tipos de cáncer que muestren una mayor expresión o actividad del c-Kit.

Típicamente, se seleccionan antisueros policlonales con un título de 104 o mayor y se analizan de acuerdo a su reactividad cruzada frente a proteínas no-c-Kit o incluso otras proteínas relacionadas de otros organismos, usando un inmunoensayo de unión competitiva. Los antisueros policlonales específicos y los anticuerpos monoclonales se unirán normalmente con una Kd de al menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente a al menos aproximadamente 1 μ M, opcionalmente a al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y opcionalmente a 0,01 μ M o mejor.

En algunas realizaciones, puede ser utilizado un anticuerpo c-kit para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede utilizar un anticuerpo de este tipo para reducir o eliminar una función biológica de c-Kit como se describe a continuación. Es decir, la adición de anticuerpos anti-c-Kit (tanto policlonales como preferiblemente monoclonales) a tejido de melanoma maligno (o una población de células que contiene células cancerosas) puede reducir o eliminar el melanoma. Generalmente, se prefiere al menos una disminución del 25% en la actividad, el crecimiento, el tamaño o similares, siendo particularmente preferido al menos aproximadamente una del 50% y aproximadamente siendo especialmente preferida una disminución de 95-100%.

A menudo, los anticuerpos frente a las proteínas c-kit para aplicaciones terapéuticas son anticuerpos humanizados (por ejemplo, Xenex Biosciences, Mederex, Inc., Abgenix, Inc., Protein Design Labs, Inc.). Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos (tales como anticuerpos de Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las regiones marco (FR) son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)). La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al, Science 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias CDRs o CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. No. 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991)). De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden hacer mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja bastante a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento del gen, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg y otros, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild et al, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

50 Detección de la actividad

Como se aprecia por cualquier experto en la técnica, la actividad de c-Kit se puede detectar para evaluar los niveles de expresión o para identificar los inhibidores de la actividad. La actividad se puede evaluar usando una variedad de ensayos in vitro e in vivo, incluyendo la actividad de unión del ligando y la actividad de la tirosina quinasa. En algunas realizaciones, discutidos con mayor detalle a continuación, los inhibidores se pueden identificar usando criterios de valoración adicionales, tales como los asociados con la transformación. Normalmente la actividad de c-Kit se determina midiendo la capacidad de unirse a una proteína con la que interactúa, por ejemplo, un anticuerpo, ligando, u otras proteínas, tales como moléculas de señalización que contienen dominios SH2.

Diagnóstico/pronóstico de enfermedades

Se pueden utilizar c-Kit y secuencias de ácidos nucleicos SHP2 y polipéptidos para el diagnóstico o pronóstico del melanoma en un paciente. Por ejemplo, como se describe anteriormente, se puede determinar la secuencia, el nivel

o la actividad de c-Kit en una muestra de melanoma de un paciente, en el que una alteración, por ejemplo, un aumento en el nivel de expresión o de actividad de c-Kit, o la detección de un aumento en el número de copias o una mutación en la secuencia de c-Kit, indica la presencia o la probabilidad de melanoma.

5 A menudo, se pueden utilizar estos métodos en combinación con otros métodos de diagnóstico, por ejemplo, la detección de otros indicadores de melanoma, por ejemplo, la morfología celular y similar. En otras realizaciones, una muestra de tejido que se sabe que contiene células de melanoma, por ejemplo, de un tumor, será analizado en busca de defectos c-Kit para determinar información sobre el cáncer, por ejemplo, la eficacia de ciertos tratamientos, tales como agentes terapéuticos que se dirigen a tirosina quinasa receptoras, tales como mesilato de imatinib, la esperanza de supervivencia y similares.

10 En algunas realizaciones, se puede utilizar el análisis de las células de melanoma para la presencia de defectos de c-Kit o una mutación de la secuencia SHP2 para determinar el pronóstico de un paciente con melanoma o para determinar la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, si se detecta el melanoma usando una técnica que no sea mediante la detección de c-Kit, por ejemplo, mediante la biopsia del tejido, entonces, la presencia o la ausencia de un defecto de c-Kit se pueden utilizar para determinar el pronóstico para el paciente, es decir, la presencia de un defecto en c-Kit, o la mutación de la secuencia SHP2, suelen indicar una esperanza de la reducción de la supervivencia en el paciente en comparación con un paciente con melanoma pero con un nivel normal de c-Kit. En la presente memoria, "esperanza de supervivencia" se refiere a una predicción con respecto a la gravedad, la duración, o el progreso de una enfermedad, afección, o cualquier síntoma de la misma. Una "presencia de diagnóstico" puede ser un aumento en el número de copias de c-KIT, aumento de los niveles de ARNm de c-KIT o proteína y/o presencia de mutaciones en la secuencia de c-KIT o SHP2 que alteran la función.

Cualquier muestra biológica sospechosa de contener células de melanoma puede ser evaluada para determinar la progresión. Por ejemplo, pueden ser analizados tejidos de los órganos viscerales, sangre, ganglios linfáticos y similares para detectar la presencia de mutaciones de la secuencia de c-Kit o SHP2 y/o aumentos en el número de copias de c-kit y/o la expresión.

25 La presencia de una mutación particular también puede indicar que un melanoma puede o no puede ser sensible a ciertos tratamientos, por ejemplo, mesilato de imatinib. Por ejemplo, los melanomas que tienen mutaciones en la región yuxtamembrana no pueden ser sensibles a mesilato de imatinib.

Los métodos de la descripción se pueden utilizar para determinar el curso óptimo del tratamiento en un paciente con cáncer. Por ejemplo, la presencia de un aumento en el número de copias de c-KIT y/o un nivel elevado de c-Kit y/o una mutación de la secuencia en c-Kit puede indicar que ciertos agentes terapéuticos, tales como los que reconocen a tirosina quinasa receptoras, serán beneficiosos para los pacientes. Además, puede establecerse una correlación fácilmente entre la presencia de un defecto en c-Kit y/o una mutación de secuencia en SHP2, y la eficacia relativa de uno u otro agente anti-melanoma. Tales análisis se pueden realizar, por ejemplo, a posteriori, es decir, mediante el análisis de un defecto de c-Kit y mutación de secuencia SHP2 en las muestras tomadas previamente a partir de pacientes que han sido padecido posteriormente uno o más tipos de terapia contra el cáncer, por ejemplo, las terapias que reconocen tirosina quinasa receptoras y correlacionar la presencia del defecto con la conocida eficacia del tratamiento.

Detección de inhibidores o moduladores de c-KIT

40 En otro aspecto, se describen en este documento métodos de tratamiento de melanoma que sobreexpresan y/o tienen una mutación en c-KIT, donde el método comprende administrar un inhibidor de c-KIT. Los inhibidores de c-KIT son conocidos, incluyendo, por ejemplo, el mesilato de imatinib. El mesilato de imatinib, que inhibe el producto de la oncoproteína de la translocación cromosómica Philadelphia, BCR-ABL, inhibe otros miembros de la familia del receptor del dominio tipo III de tirosina quinasa dividido, incluyendo Kit, PDGF-R α y FLT-3 (véase, por ejemplo, la revisión de Wong & Witte en Annu Rev Immunol. 22: 247-306, 2004). También se han identificado otros inhibidores de molécula pequeña de la actividad de tirosina quinasa KIT. Estos incluyen indolinonas y anilinoftalazinas (véase, por ejemplo, Ma et al., J. Invest. Dermatol. 114: 392-394, 2000; Smolich et al. Blood 97: 1413-1421, 2001; Krystal et al. Cancer Res. 61: 3660-3668, 2001; Mendel et al, Anticancer Drug Des 15: 29-41, 2000; y Wood et al. Cancer Res. 60: 2178-2189, 2000). Medicamentos particulares en estas clases incluyen SU6668 y SU5416 (SUGEN Inc. South San Francisco, Calif.).

50 Otros inhibidores incluyen inhibidores tales como anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos y similares. Tal como se usa en el presente documento, un inhibidor de c-Kit es una molécula que modula la expresión del ácido nucleico de c-Kit y/o la actividad de la proteína de c-Kit.

El método de cribado de los moduladores de compuestos pueden emplear, por ejemplo, células de melanoma en la que c-kit se sobre-expresa o se amplifica. Tales moduladores pueden ser moduladores de tirosina quinasa receptora candidatos.

Pueden ser identificados inhibidores de c-kit adicionales por el ensayo de la actividad de c-kit, por ejemplo, por unión o actividad enzimática. Tales ensayos emplean secuencias de c-kit o fragmentos conocidos, por ejemplo, el dominio

extracelular de c-kit, o variantes de los mismos. Una secuencia del polipéptido de la secuencia c-kit humana ejemplar que podría ser utilizada en tales ensayos se proporciona en la SEQ ID NO: 2.

Los ensayos de actividad se usan para identificar inhibidores que se pueden utilizar como agentes terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos para c-Kit y antagonistas de la actividad c-Kit. Los inhibidores de la actividad de c-Kit son examinados usando polipéptidos de c-kit, ya sean recombinantes o de origen natural. La proteína puede aislarse, expresarse en una célula, expresarse en tejidos o en un animal, ya sea recombinante o de origen natural. Por ejemplo, se pueden utilizar células transformadas. La modulación se ensaya utilizando uno de los ensayos in vitro o in vivo descritos en este documento. La actividad también puede ser examinada in vitro con reacciones en estado soluble o sólido, utilizando un fragmento de c-Kit que se une a otra proteína, por ejemplo, un ligando de c-KIT.

En otra realización, los niveles de ARNm y/o de expresión de proteínas se pueden medir para evaluar los efectos de un compuesto de ensayo sobre los niveles de expresión de c-Kit. Una célula huésped que expresa c-Kit se pone en contacto con un compuesto de ensayo durante un tiempo suficiente para efectuar cualquier interacción, y entonces se mide el nivel de ARNm o de proteína. La cantidad de tiempo para efectuar dichas interacciones puede determinarse empíricamente, tal como mediante la ejecución de un curso de tiempo y midiendo el nivel de expresión como una función de tiempo. La cantidad de expresión se puede medir mediante el uso de cualquier método conocido por los expertos en la técnica por ser adecuado.

La cantidad de expresión entonces se compara con la cantidad de expresión en ausencia del compuesto de ensayo. Una célula sustancialmente idéntica puede derivarse de las mismas células a partir de las cuales se preparó la célula recombinante pero que no habían sido modificadas por la introducción del ADN heterólogo. Una diferencia en la cantidad de expresión indica que el compuesto de ensayo tiene de alguna manera niveles de c-Kit alterados.

En ensayos que identifican a los inhibidores de c-kit, las muestras que se tratan con un inhibidor potencial se comparan con muestras de control para determinar la extensión de la modulación. A las muestras de control (no tratadas con inhibidores candidatos) se les asigna un valor de actividad relativa de 100. La inhibición de c-Kit se consigue cuando el valor de actividad con respecto al control es de aproximadamente 80%, opcionalmente 50%, opcionalmente 25-0%.

Los compuestos ensayados como inhibidores de c-kit pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, por ejemplo, una macromolécula tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Alternativamente, los moduladores pueden ser alterados genéticamente en versiones de c-Kit. Típicamente, los compuestos de ensayo serán moléculas químicas pequeñas y péptidos o anticuerpos.

En algunas realizaciones, los agentes tienen un peso molecular de menos de 1.500 daltons y, en algunos casos, menos de 1.000, 800, 600, 500 ó 400 daltons. El tamaño relativamente pequeño de los agentes puede ser deseable porque las moléculas más pequeñas tienen una mayor probabilidad de tener propiedades fisicoquímicas compatibles con buenas características farmacocinéticas, incluyendo la absorción oral de agentes con mayor peso molecular. Por ejemplo, fueron descritos agentes menos probables de tener éxito como medicamentos basados en la permeabilidad y solubilidad por Lipinski et al. de la siguiente manera: tienen más de 5 donantes de puentes de H (expresados como la suma de OH y NH); tienen un peso molecular de más de 500; tienen un LogP de más de 5 (o MLogP sobre 4,15); y/o tiene más de 10 aceptores de puentes de H (expresados como la suma de N y O). Véase, por ejemplo, Lipinski et al. *Adv Drug Delivery Res* 23: 3-25 (1997). Las clases de compuestos que son sustratos para los transportadores biológicos suelen ser excepciones a la regla.

Esencialmente puede ser usado cualquier compuesto químico como modulador potencial o ligando en los ensayos de la descripción.

Muy a menudo, los compuestos pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos están diseñados para cribar grandes bibliotecas químicas mediante la automatización de los etapas de ensayo, que normalmente se ejecutan en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robotizados). Se apreciará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Suiza) y similares.

Ensayos de expresión

Ciertos métodos de cribado implican la detección de un compuesto que modula la expresión de c-Kit. Tales métodos implican generalmente la realización de ensayos basados en células en las que se ponen en contacto los compuestos de ensayo con una o más células que expresan un c-Kit y luego la detección de una disminución de la expresión (ya sea la transcripción o el producto de la traducción). Dichos ensayos se realizan a menudo con células que sobreexpresan c-Kit.

La expresión puede ser detectada en un número de diferentes maneras. Como se describe en este documento, los niveles de expresión de la proteína en una célula se pueden determinar mediante el sondeo del ARNm expresado en una célula con una sonda que se hibrida específicamente con un transcrito de c-Kit (o el ácido nucleico

complementario derivado del mismo). Alternativamente, la proteína se puede detectar usando métodos inmunológicos en los que un lisado celular se sondea con anticuerpos que se unen específicamente a la proteína.

Otros ensayos basados en células son ensayos reporteros llevados a cabo con células que no expresan la proteína. A menudo, estos ensayos se llevan a cabo con una construcción de ácido nucleico heteróloga que incluye un promotor que está unido operativamente a un gen indicador que codifica un producto detectable.

Inhibidores de ácido nucleico

En algunas realizaciones, los inhibidores de c-kit son moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, pueden usarse ribozimas, ARN antisentido y/o moléculas de ARN interferente pequeño (siARN) para reconocer al c-Kit.

En algunas realizaciones, las moléculas de siARN se utilizan como inhibidores de c-KIT. En células de mamíferos, la introducción de dsARN largos (> 30 nt) a menudo inicia una respuesta antiviral potente, ejemplificada por la inhibición no específica de la síntesis de proteínas y la degradación del ARN. El fenómeno de la interferencia de ARN se describe y se discute, por ejemplo, en Bass, *Nature* 411: 428-29 (2001); Elbahir et al, *Nature* 411: 494-98 (2001); y Fire et al., *Nature* 391: 806-11 (1998), donde se discuten también métodos de preparación de ARN de interferencia. Los siARN en base a las secuencias de c-Kit descritas en este documento son menos de 100 pares de bases, típicamente 30 bps o más cortos, y son hechos por métodos conocidos en la técnica. Los siARN ejemplares podrían tener hasta 29 bps, 25 bps, 22 bps, 21 bps, 20 bps, 15 bps, 10 bps, 5 bps o cualquier número entero o alrededor del mismo entre los mismos.

El siARN puede comprender dos moléculas complementarias, o pueden construirse de tal manera que un único transcrito tiene tanto secuencias complementarias sentido como antisentido del gen diana, por ejemplo, una horquilla.

Se conocen métodos para el diseño de ARN de doble cadena que inhiben la expresión de genes en una célula diana (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 6.506.559; Elbahir et al *Methods* 26: 199-213, 2002; Chalk et al., *Biochem. Biophys Res. Comm* 319: 264-274, 2004; Cui et al. *Computer Method and Programs in Biomedicine* 75: 67-73, 2004, Wang et al, *Bioinformatics* 20: 1818-1820, 2004). Por ejemplo, el diseño de siARN (incluyendo las horquillas) siguen típicamente las reglas termodinámicas conocidas (véase, por ejemplo, Schwarz, et al, *Cell* 115: 199-208, 2003; Reynolds et al, *Nat Biotechnol.* 22: 326-30, 2004; Khvorova, et al, *Cell* 115: 209-16, 2003). Muchos programas de ordenador están disponibles para la selección de regiones de c-Kit que son sitios diana adecuados. Estos incluyen programas disponibles a través de fuentes comerciales tales como Ambion, Dharmacon, Promega, Invitrogen, Ziegen y GenScript, así como fuentes no comerciales tales como EMBOSS, The Wistar Institute, Instituto Whitehead y otros.

Por ejemplo, el diseño se puede basar en las siguientes consideraciones. Típicamente se seleccionan secuencias más cortas, es decir, menos de aproximadamente 30 nucleótidos. La región de codificación del ARNm es generalmente reconocida. La búsqueda de una secuencia diana apropiada comienza opcionalmente 50-100 nucleótidos cadena abajo del codón de inicio, ya que las proteínas de unión de región no traducida y/o los complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo de endonucleasa de siRNP. Algunos algoritmos, por ejemplo, basados en el trabajo de Elbahir et al., supra, buscan un motivo AA de secuencia de 23 nt (N19) TT (SEQ ID NO: 5) (N, cualquier nucleótido) y seleccionan las entradas con aprox. 50% del contenido de G/C (de 30% a 70% también ha trabajado en ellos). Si no se encuentran secuencias adecuadas, la búsqueda se extiende usando el motivo NA (N21) (SEQ ID NO: 24). La secuencia del siARN sentido corresponde a (N19) TT (SEQ ID NO: 25) o N21 (SEQ ID NO: 26) (posición de 3 a 23 del motivo de 23-nt), respectivamente. En este último caso, el extremo 3' del sentido siARN se convierte a TT.

Otros algoritmos preferiblemente seleccionan siARN correspondientes al motivo diana NAR (N17) SNN (SEQ ID NO: 27), donde R es purina (A, G) e Y es pirimidina (C, U). Por consiguiente, los respectivos siARN sentido y antisentido de 21-nt comienzan con un nucleótido de purina y también pueden expresarse a partir de vectores de expresión de pol III sin un cambio en el sitio de reconocimiento; la expresión de los ARN de promotores de pol III sólo es eficaz cuando el primer nucleótido transcrito es una purina.

También pueden ser diseñados otros ácidos nucleicos, por ejemplo, ribozimas, antisentido, en base a principios conocidos. Por ejemplo, Sfold (véase, por ejemplo, Ding, et al., *Nucleic Acids Res.* 32 Ejemplar del Servidor Web, W135-W141, Ding y Lawrence, *Nucl. Acids Res.* 31: 7280, 7301, 2003; y Ding y Lawrence, *Nucl. Acids Res.* 20: 1034-1046, 2001) proporcionan programas relacionados con el diseño de ribozimas y antisentido, así como siARN.

Tratamiento del melanoma y administración de productos farmacéuticos y composiciones de vacuna

Se pueden administrar inhibidores de c-Kit a un paciente para el tratamiento de melanomas. Como se describe en detalle a continuación, los inhibidores se administran de cualquier manera adecuada, opcionalmente con vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, se administra el mesilato de imatinib, o enantiómeros, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. El mesilato de imatinib está disponible en Novartis (Basilea, Suiza) (Savage, D. G. y Antman, K. H. (2002) *N. Engl. J. Med.* 346(9): 683-93; Mauro, M. J. et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(1): 325-34; Schiffer, C. A. (2001) *Semin. Oncol.* 28(5 Supl. 17): 34-9; Demetri, G. D. (2001) *Semin.*

Oncol. 28(5 Supl. 17): 19-26; Griffin, J. (2001) Semin. Oncol. 28(5 Supl. 17): 3-8; Verweij, J. et al. (2001) Eur. J. Cancer. 37(15): 1816-9; Shah, N. P. y Sawyers, C. L. (2001) Curr. Opin. Investig. Drugs. 2(3): 422-3). Los protocolos para la administración de inhibidores, tal como el mesilato de imatinib, son conocidos (véase, por ejemplo, J Clin Oncol. 1 de diciembre de 2003; 21 (23): 4342-9) y se pueden optimizar aún más para los pacientes con melanoma en base a los principios conocidos en las técnicas farmacológicas (Remington Pharmaceutical Sciences, 17ª ed, 1989).

Se conocen otros inhibidores de c-KIT. Por ejemplo, los compuestos que tienen un estructura de indolina se informaron como los que muestran la acción inhibitoria de quinasa c-Kit (documento WO 01/45689). También había un informe relativo a la acción inhibitoria sobre la quinasa c-Kit por los compuestos que tienen una estructura de quinazolina (documento WO 01/47890). Otros inhibidores de c-kit conocidos incluyen CT52923, PD173955, XL820, SU11248 y SU5614. Aunque puede ser deseable usar un inhibidor específico de c-KIT, los inhibidores de c-KIT se pueden administrar también para que reconozcan otras tirosina quinasa receptoras. Por ejemplo, el SU11248 (Sutent, Pfizer) es un inhibidor de tirosina quinasa receptora de dianas múltiples que reconoce 3 tirosina quinasa distintas del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1, -2 y -3), receptor alfa y beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α y - β), receptoras de KIT, y tirosina quinasa 3/Flk2 fms relacionadas (FLT3). El dasatinib (Bristol Myers Squibb, BMS-354825) es un inhibidor de quinasa de pequeña molécula. El dasatinib es también un inhibidor de SRC, así como un inhibidor de abl.

Los inhibidores se pueden administrar a un paciente en dosis terapéuticamente eficaces para prevenir, tratar o controlar el melanoma. Los compuestos se administran a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta protectora o terapéutica eficaz en el paciente. Una respuesta terapéutica eficaz es una respuesta que, al menos parcialmente, detiene o retrasa los síntomas o las complicaciones de la enfermedad. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". La dosis se determinará por la eficacia de los inhibidores de c-Kit particulares empleados y la condición del sujeto, así como por el peso corporal o el área superficial de la zona a tratar. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, la naturaleza y la extensión de cualquier efecto adverso que acompañe la administración de un compuesto o vector particular en un sujeto particular.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren compuestos que exhiban índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden utilizar compuestos que exhiban efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar el sistema de administración que reconoce dichos compuestos en el sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células normales y, por lo tanto, para reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y de los estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye una ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración. Para cualquier compuesto utilizado en los métodos de la descripción, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones en plasma circulante que incluya la IC₅₀ (la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición media máxima de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En general, la dosis equivalente de un modulador es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular por medio de técnicas estándar utilizando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Los compuestos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para su administración por cualquier vía adecuada, incluyendo por vía de la inhalación, tópica, nasal, oral, parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, intravesical o intratecal) o por vía rectal.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen agentes de unión, por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa; cargas, por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato sódico; o agentes humectantes, por ejemplo, lauril sulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, agentes de suspensión, por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo,

lecitina o goma arábiga; vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados; y conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico. Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y/o edulcorantes, según sea apropiado. Si se desea, las preparaciones para la administración oral se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración por inhalación, los compuestos se pueden administrar convenientemente en la forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, por ejemplo, de lactosa o almidón.

Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en la forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, por ejemplo, de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

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

Además, los compuestos se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

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

Inhibidores de la expresión génica

Los inhibidores de c-Kit también pueden comprender moléculas de ácidos nucleicos que inhiban la expresión de c-Kit. Pueden ser utilizados métodos de transferencia génica virales y no virales convencionales para introducir los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de c-Kit genéticamente modificados en células de mamíferos o tejidos diana, o alternativamente, ácidos nucleicos, por ejemplo, los inhibidores de la actividad de c-Kit, tales como siARN, ribozimas, o ARN anti-sentido. Los sistemas de administración de vectores no víricos incluyen plásmidos de ADN, ácidos nucleicos desnudo, y ácido nucleico complejado con un vehículo de administración tal como un liposoma. Los sistemas de administración de vectores virales incluyen virus de ADN y ARN, que tienen ya sea genomas episómicos o integrados después de su administración a las células. Para una revisión de procedimientos de terapia génica, véase Anderson, *Science* 256: 808-813 (1992); Nabel y Felgner, *TIBTECH* 11: 211-217 (1993); Mitani y Caskey, *TIBTECH* 11: 162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11: 167-175 (1993); Miller, *Nature* 357: 455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6 (10): 1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35-36 (1995); Kremer y Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51 (1): 31-44 (1995); Haddada et al, en *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Doerfler y Böhm (eds) (1995); y Yu et al, *Gene Therapy* 1: 13-26 (1994).

En algunas realizaciones, se administran siARNs. La terapia de siARN se lleva a cabo mediante la administración a un paciente un siARN por vectores estándar que codifican los siARN y/o los sistemas de administración de genes, tales como mediante la administración de moléculas de siARN sintéticas. Típicamente, las moléculas de siARN sintéticas se estabilizan químicamente para evitar la degradación de nucleasa in vivo. Los métodos para preparar moléculas de ARN químicamente estabilizadas son muy conocidos en la técnica. Típicamente, tales moléculas comprenden estructuras modificadas y nucleótidos para evitar la acción de ribonucleasas. Otras modificaciones son también posibles, por ejemplo, siARN conjugados con colesterol han mostrado propiedades farmacológicas mejoradas (véase, por ejemplo, Song et al. *Nature Med.* 9: 347-351 (2003)).

Métodos de administración no virales

Los métodos de administración no vírica de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos modificados de la invención incluyen lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización o lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales y la absorción potenciada por agente de ADN. La lipofección se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 5.049.386, la patente de EE.UU. N° 4.946.787;

y la patente de EE.UU. N° 4.897.355) y los reactivos de lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectina™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para la lipofección eficiente de reconocimiento de receptores de polinucleótidos incluyen los de Felgner, documento WO 91/17424, documento WO 91/16024. La administración puede ser a las células (administración ex vivo) o tejidos diana (administración in vivo).

- 5 La preparación de complejos de lípidos:ácidos nucleicos, incluyendo liposomas dirigidos tales como complejos de inmunolipídicos, es muy conocida para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Crystal, Science 270: 404-410 (1995); Blaese et al, Cancer Gene Ther. 2: 291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5: 382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5: 647-654 (1994); Gao et al, Gene Therapy 2: 710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52: 4817-4820 (1992); patentes de EE.UU. Nos. 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 10 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028 y 4.946.787).

Métodos de administración viral

- El uso de sistemas basados en virus de ARN o ADN para la administración de inhibidores de c-Kit son conocidos en la técnica. Los sistemas basados en virus convencionales para la administración de inhibidores de ácidos nucleicos de c-kit pueden incluir vectores retrovirales, lentivirus, adenovirales, adeno-asociados y virus del herpes simple para 15 la transferencia de genes.

- En muchas aplicaciones de terapia génica, es deseable que el vector de la terapia génica se pueda administrar con un alto grado de especificidad a un tipo de tejido particular, por ejemplo, un tejido de páncreas o mamario. Un vector viral es normalmente modificado para que tenga especificidad para un tipo de célula dado por la expresión de un ligando como una proteína de fusión con una proteína de la cubierta viral en la superficie exterior de los virus. El 20 ligando se elige para que tenga afinidad por un receptor que se sabe que está presente en el tipo celular de interés. Por ejemplo, Han et al, PNAS 92: 9747-9751 (1995), informó que el virus de la leucemia murina de Moloney puede modificarse para expresar la herregulina humana fusionada a gp70, y el virus recombinante infecta ciertas células de cáncer humano que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. Este principio puede extenderse a otros pares de virus que expresan una proteína de fusión de ligando y la célula diana que expresa un 25 receptor. Por ejemplo, el fago filamentoso puede diseñarse para que muestre fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab o Fv) que tienen afinidad de unión específica para virtualmente cualquier receptor celular seleccionado. Aunque la descripción anterior se aplica fundamentalmente a vectores víricos, los mismos principios pueden aplicarse a vectores no virales. Tales vectores pueden ser diseñados para que contengan secuencias de captación específicas que se cree que favorecen la absorción por las células diana específicas.

- 30 Los vectores de terapia génica pueden administrarse in vivo mediante la administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o infusión intracraneal) o por aplicación tópica, como se describe a continuación. Alternativamente, los vectores pueden administrarse a células ex vivo, tales como células explantadas de un paciente individual.

- La transfección de células ex vivo para el diagnóstico, la investigación o para terapia génica (por ejemplo, a través de la re-infusión de células transfectadas en el organismo anfitrión) es bien conocida por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las células se aíslan del organismo del sujeto, se transfectan con ácidos nucleicos 35 inhibidores de c-Kit y se re-infusionan de nuevo en el organismo del sujeto (por ejemplo, del paciente). Diversos tipos de células adecuadas para la transfección ex vivo son muy conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Freshney et al., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (tercera ed. 1994)) y las referencias que allí se citan para una discusión de cómo aislar y cultivar células de pacientes).

- Se pueden administrar también vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos terapéuticos directamente al organismo para la transducción de células in vivo. Alternativamente, puede ser administrado ADN desnudo. La administración es mediante cualquiera de las rutas utilizadas normalmente para 40 introducir una molécula en contacto directo con sangre o células de tejidos. Los métodos adecuados de administración de tales ácidos nucleicos están disponibles y son bien conocidos por los expertos en la técnica y, aunque pueda utilizarse más de una ruta para administrar una composición particular, una ruta en particular puede proporcionar a menudo una reacción más inmediata y más eficaz que otra ruta.

- Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, existe una 50 amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas, como se describe a continuación (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences of, 17ª ed., 1989).

- En algunas realizaciones, los polipéptidos c-Kit y los polinucleótidos también se pueden administrar como composiciones de vacuna para estimular una respuesta inmune, típicamente una respuesta celular (CTL y/o HTL). Tales composiciones de vacuna pueden incluir, por ejemplo, péptidos lipidificados (véase, por ejemplo, Vitiello, A. et al., J. Clin. Invest. 95: 341 (1995)), microesferas ("PLG") de composiciones peptídicas encapsuladas en poli(DL-lactida-co-glicólido) (véase, por ejemplo, Eldridge, et al., Molec. Immunol. 28: 287-294 (1991); Alonso et al, Vaccine 12: 299-306 (1994); Jones et al, Vaccine 13: 675-681 (1995)), composiciones peptídicas contenidas en complejos 55 inmunoestimulantes (ISCOMS) (véase, por ejemplo, Takahashi et al., Nature 344: 873-875 (1990); Hu et al., Clin Exp

5 Immunol 113: 235-243 (1998)), sistemas de péptido de múltiples antígenos (MAP) (véase, por ejemplo, Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5409-5413 (1988); Tam, J. Immunol. Methods 196: 17-32 (1996)), péptidos formulados como péptidos multivalentes; péptidos para uso en sistemas balísticos de administración, típicamente péptidos cristalizados, vectores de administración viral (Perkus, et al., en: Concepts in vaccine development (Kaufmann, ed., p. 379, 1996); Chakrabarti, et al, Nature 320: 535 (1986); Hu et al, Nature 320: 537 (1986); Kieny, et al, AIDS Bio/Technology 4: 790 (1986); Top et al., J. Infect. Dis. 124: 148 (1971); Chanda et al, Virology 175: 535 (1990)), partículas de origen viral o sintético (véase, por ejemplo, Kofler et al, J. Immunol. Methods. 192: 25 (1996); Eldridge et al., Sem. Hematol. 30: 16 (1993); Falo et al., Nature Med. 7: 649 (1995)), coadyuvantes (Warren et al, Annu. Rev. Immunol. 4: 369 (1986); Gupta et al, Vaccine 11: 293 (1993)), liposomas (Reddy et al, J. Immunol. 148: 1585 (1992); Rock, Immunol. Today 17: 131 (1996)), o, cDNA desnudo o absorbido en partículas (Ulmer, et al, Science 259: 1745 (1993); Robinson et al, Vaccine 11: 957 (1993); Shiver et al, en: Concepts in vaccine development (Kaufmann, ed, p. 423, 1996); Cesar y Berzofsky, Annu. Rev. Immunol. 12: 923 (1994) y Eldridge et al, Sem. Hematol. 30: 16 (1993)). También se pueden usar tecnologías de administración específicas de toxinas, también conocidas como reconocimiento mediado por receptores, tales como las de Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Mass.).

15 Kits para uso de aplicaciones diagnósticas y/o pronósticas

También se proporcionan kits para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Para aplicaciones de diagnóstico/pronósticas, tales kits pueden incluir cualquiera o todos de los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, c-KIT y/o sondas SHP-2, cebadores, anticuerpos o similares.

20 Además, los kits pueden incluir materiales de instrucción que contienen directrices (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos descritos en este documento. Mientras que los materiales de instrucción comprenden materiales típicamente escritos o impresos que no se limitan a los mismos. Cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final está contemplado por esta invención. Tales medios incluyen, pero no se limitan a medios electrónicos de almacenamiento (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionen estos materiales de instrucción.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Examen de los perfiles del número de copias de 103 melanomas primarios

30 Las rutas de MAP-quinasa y PI3 quinasa se activan de forma diferente entre los subtipos de melanoma cuando los tumores se clasifican de acuerdo a una combinación de la exposición UV y el sitio anatómico (Curtin, et al., New Engl. J. Med. 353: 2135-2147, 2005). De manera prominente, mientras que las mutaciones de BRAF son altamente prevalentes (59%) en los melanomas que se producen en la piel sin signos de daño crónico inducido por el sol (melanomas no CSD), la frecuencia es muy baja en los melanomas que se producen en las palmas de las manos, plantas de los pies o en los sitios subungueales o (melanomas de la mucosa acral, respectivamente). Las mutaciones BRAF también son poco comunes en los melanomas que se producen en la piel lo que muestra evidencia de daño crónico inducido por el sol (melanomas CSD). Alrededor del 10 al 20% de los melanomas de todos los subtipos activan estas rutas por mutación de las NRAS, pero las mutaciones de tanto NRAS como BRAF no ocurren nunca al mismo tiempo. Estos resultados plantean la cuestión fundamental de cómo la ruta de la MAP quinasa puede ser activada en aquellos tumores que no tienen mutaciones de NRAS o BRAF.

40 La matriz de análisis de CGH de Curtin et al., supra, encontró diferencias en las características de las aberraciones del número de copias de ADN entre los subtipos de melanoma, con diferencias significativas en la frecuencia de la participación de varios loci. El examen de los perfiles del número de copias de 103 melanomas primarios de este estudio (datos disponibles en GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; número de entrada GSE2631), halló el aumento (10 tumores) o la amplificación (7 tumores) del cromosoma 4p12, Fig. 2. Dieciséis de estos tumores se habían secuenciado para BRAF y NRAS y no se encontraron mutaciones. Todos los 17 tumores eran de los subtipos acral, mucosal o CDS.

Ejemplo 2 - Inmunohistoquímica e hibridación in situ para c-Kit

50 La región 4p12 común de elevación del número de copias contiene varios receptores tirosina quinasa (RTK) que son atractivos oncogenes candidato de melanoma. Estos incluyen el v-kit Hardy-Zuckerman 4 del c-Kit homólogo del oncogén viral del sarcoma felino, el receptor KDR del factor de crecimiento endotelial vascular y el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA). El c-Kit es un gen esencial para la supervivencia de melanocitos y el desarrollo (Chabot, et al, Nature 335: 88-89, 1988; Geissler, et al, Cell 55: 185-192, 1988) y está sujeto a mutaciones oncogénicas en una variedad de tipos de cáncer (Beghini et al, Cancer 92: 657-662, 2001; Beghini et al, Blood Cells Molecules and Diseases 24: 262-270, 1998; Isozaki, et al, Am J. Path. 157: 1581-1585, 2000; Lux, et al., Am. J. Path. 156:791-795, 2000; Wardelmann, et al., Mod. Pathology 15: 125-136, 2002). Sin embargo, investigaciones anteriores han descartado, en general, su importancia en el melanoma porque la expresión parecía estar perdida durante la progresión tumoral (Lassam y Bickford, Oncogene 7: 51-56, 1992; Natali, et al, Int. J. Cancer 52: 197-201, 1992; Zakut, et al, Oncogene 8: 2221-2229, 1993; Huang, et al, Oncogene 13: 2339-2347, 1996; Montone, et al., Mod. Pathology 10: 939-944, 1997). El KDR es importante en la angiogénesis

(Millauer et al., Cell 72: 835-846, 1993) y en el desarrollo de tumores sólidos (Millauer et al., Nature 367: 576-579, 1994) y se expresa comúnmente en melanoma (Straume y Akslen, Am J Pathol 159: 223-235, 2001). El PDGFRA se encuentra que se activa por mutaciones o deleciones pequeñas en un subconjunto de tumores gastrointestinales estromales (GIST) (Heinrich, et al, Science 299: 708-710, 2003) y en la leucemia mieloide aguda infantil (Hiwatari, et al., Leukemia 19: 476-477, 2005).

Se realizó la inmunohistoquímica para PDGFRA y KDR y la hibridación in situ para PDGFRA en microsistemas de tejidos y se encontró que aunque ambos genes se expresaban en subconjuntos de melanomas, no hubo asociación entre el aumento del número de copias en 4q12 y la expresión de proteínas o ARN (datos no mostrados). Además, la secuenciación de los sitios de mutación común de PDGFRA, los exones 10, 12, 14 y 18 (Heinrich, et al., Science 299: 708-710, 2003), en los casos con amplificación de 4q12 no mostraron ninguna mutación. En contraste, ocho de los once (73%) melanomas con un aumento de copias 4q12 que se probaron para la expresión de c-kit mediante inmunohistoquímica empleando concentraciones de anticuerpos convencionales (véase métodos) indicaron un aumento en la expresión de c-kit. El análisis de secuencia de los sitios de mutación comunes de c-Kit, los exones 11, 13, 17 y 18 en las siete muestras con amplificaciones en c-Kit encontraron tres muestras con mutaciones. Las tres muestras mostraron una mutación K642E, y una tenía una mutación adicional en el resto N566D (Tabla 2). La mutación K642E es oncogénica (Isozaki, et al, Am J. Path 157: 1581-1585, 2000) y se produce en GIST esporádicas (Lux, et al, Am J. Path 156: 791-795, 2000) y familiares (Isozaki, et al., Am. J. Path. 157: 1581-1585, 2000). La amplificación en 4q12 dirigida al alelo mutado en los tres casos, indicada por la altura del pico de las trazas de secuenciación, y la proteína c-Kit fue altamente expresada en los tres casos (Fig. 2). Estos hallazgos indicaron que c-Kit fue el gen que conducía la selección de los aumentos del número de copias en 4q12 en al menos estos tres casos, y motivaron la secuenciación de estos mismos exones c-kit en el resto de los tumores para determinar si las mutaciones se producían en ausencia de cambios del número de copias. Se encontraron mutaciones codificantes en 14 tumores (14%) y una eliminación intrónica en un tumor adicional (Tabla 3). El análisis del ADN de tejido normal adyacente para los casos de c-kit-mutante de la que se podría obtener, 8/15, no se encontraron mutaciones, lo que indica que las mutaciones fueron adquiridas de forma somática.

Las frecuencias de aberraciones c-Kit (es decir, los aumentos de las mutaciones de secuencia o el número de copias) en los diferentes subgrupos de melanoma variaban en aproximadamente la imagen especular con mutaciones BRAF. Las aberraciones c-kit en los melanomas de mucosa, acral, CDS y no CSD estaban presentes en el 39%, 26%, 17% y 0%, respectivamente, mientras que las mutaciones de BRAF estaban presentes en el 11%, 23%, 11%, 59% (Maldonado, et al., J. Natl. Canc. Inst. 95:1878-1880, 2003; Curtin, et al., New Engl. J. Med. 353: 2135-2147, 2005).

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína c-Kit apoya aún más su papel como un oncogén de melanoma. Diez de once (91%) melanomas con mutaciones c-kit y ocho de once (73%) con los aumentos del número de copias de c-Kit mostraron una mayor expresión de la proteína c-Kit en fase de crecimiento vertical (VGP) en relación con otras partes del tumor (Tabla 2, Fig. 1), indicando que la expresión de c-Kit en el melanoma se ha mejorado en las etapas de progresión avanzadas de los tumores con aumentos de mutaciones o de dosificación del receptor. Las cuatro muestras con aumento de mutaciones de c-Kit o del número de copias que no mostraron una fuerte expresión de la proteína c-Kit en el VGP del tumor en condiciones estándar de análisis mostraron una mayor expresión en la VGP cuando se emplearon concentraciones de anticuerpo más altas. En contraste, sólo 6/19 (32%) de las muestras sin mutación c-kit detectable o número de copias para las que se disponía tejido residual para la inmunohistoquímica mostraron una elevación expresa de la proteína c-kit en el VGP. Curiosamente, los seis melanomas que expresan c-kit en los que los métodos de los inventaron no revelaron aberraciones genéticas en c-Kit (n = 6) fueron todos de tipo salvaje para BRAF o NRAS y sólo una mostró amplificación de CCND1. De este modo, la señalización de c-Kit aberrante en el melanoma puede ser activada tanto por los efectos de dosificación de genes tal como se describe para otros tipos de cáncer (Sihto, et al, J Clin Oncol 23: 49-57, 2005) como por mutación, y tal vez por otros mecanismos que alteran la expresión no valorados en el estudio de los inventores. Las frecuencias de las aberraciones de c-Kit (es decir, los incrementos de las mutaciones o del número de copias) en los diferentes subgrupos de melanoma variaban en aproximadamente la imagen especular con mutaciones BRAF (por ejemplo, la Fig. 3). Las aberraciones de c-kit en los melanomas de la mucosa, acral, CDS y no CSD estaban presentes en el 39%, 26%, 17% y 0%, respectivamente, mientras que las mutaciones de BRAF estaban presentes en el 11%, 23%, 11%, 59% (Maldonado, et al., J. Natl. Canc. Inst. 95:1878-1880, 2003; Curtin, et al., New Engl. J. Med. 353: 2135-2147, 2005).

Observamos que los resultados de los inventores relativos a la importancia de c-kit en el melanoma están en contraste con la mayoría de los estudios anteriores, que mostraban que c-kit eran reguladas durante la progresión del melanoma o que afectaban negativamente al crecimiento del tumor (Lassam y Bickford, Oncogene 7: 51-56, 1992; Natali, et al, Int. J. Cancer 52: 197-201, 1992; Zakut, et al, Oncogene 8: 2221-2229, 1993; Huang, et al, Oncogene 13: 2339-2347, 1996; Montone, et al., Mod. Pathology 10: 939-944, 1997). Sólo un estudio de los melanomas metastásicos informa de mutaciones en dos de cada 100 metástasis de melanoma y sin detalles acerca de la naturaleza del tumor primario (Willmore-Payne, et al., Hum. Pathol. 36:486-493, 2005). Creemos que esta diferencia se debe a nuestro enfoque de la clasificación del melanoma, lo que ha motivado a los inventores a utilizar una cohorte de muestra enriquecida en tumores donde c-Kit pasaba a ser activo y a la interpretación de los resultados en un contexto más amplio. Concordante con los hallazgos de los inventores, se ha publicado previamente la expresión de c-Kit a alto nivel en melanomas acrales (Ohashi, et al., Melanoma Res. 6:25-30, 1996).

Los datos de los inventores tienen importantes implicaciones para la terapia del melanoma y para la mejora de la comprensión del desarrollo del melanoma y sugieren futuras líneas de investigación. La mayoría de las mutaciones que encontramos en el melanoma han sido reportadas para otros tipos de cáncer y se cree que conducen a la activación constitutiva del receptor (Tabla 3). Doce de los melanomas en la serie de los inventores tenían mutaciones que afectaban el dominio yuxtamembrana que se espera que promoviera la dimerización en ausencia de factor de dispersión (SCF) que resulta en la activación constitutiva (Lennartsson, et al., *Oncogene* 18: 5546-5553, 1999) o para prevenir que el c-Kit mantenga su conformación auto-inhibida (Mol, et al., *J. Biol. Chem.* 279:31655-31663, 2004). Es importante destacar que para las consideraciones terapéuticas, las mutaciones en la región yuxtamembrana eran más frecuentes en la serie de los inventores (tabla) y son potencialmente sensibles a Imatinib (Frost, et al., *Mol. Canc. Ther.* 1:1115-1124, 2002; Heinrich, et al., *J. Clin. Onc.* 21:4342-4349, 2003; Ma, et al, *Blood* 99: 1741-1744, 2002). Tres de nuestros casos tenían mutaciones en el dominio quinasa que con frecuencia son resistentes a Imatinib (Heinrich, et al., *J. Clin. Onc.* 21: 4342-4349, 2003) los tipos de melanoma que contienen mutaciones de c-Kit representan una minoría de casos en las poblaciones de ascendencia europea; en todo el mundo pueden representar la mayor carga de melanoma, ya que son más comunes en personas de África, Asia y de ascendencia hispana. Además son particularmente agresivos, de manera que el impacto terapéutico de los conocimientos de estas mutaciones puede ser considerable.

La combinación de los datos de mutación, dosis y expresión de proteínas indican las complejidades de la manera en que c-Kit puede estar implicado en la señalización aberrante. En la cohorte de los inventores, sólo los melanomas con la mutación K642E mostró un aumento del número de copias de c-Kit y, por el contrario, esta mutación no se encontró en los melanomas sin aumento de la dosis o la mutación NRAS (por ejemplo, las Tablas 1 y 2). Los estudios funcionales (Tarn, et al., *Clin. Canc. Res.* 11: 3668-3677, 2005) y el hallazgo de que el alelo K642E se puede encontrar en la línea germinal (Isozaki, et al, *Am. J. Path.* 157: 1581-1585, 2000) sugiere que representa una forma de activación débil de c-Kit. Por lo tanto, esta mutación parece requerir etapas selectivas adicionales que interactúan directamente con el fin de proporcionar una señal oncogénica significativa. Todas las demás muestras con mutaciones codificantes en c-Kit no tuvieron aumentos de número de copias del locus de c-Kit y no mostraron mutaciones BRAF o NRAS, lo que sugiere que estas mutaciones tienen una señal oncogénica sustancialmente más fuerte.

Los tipos de melanomas que muestran alteraciones genéticas frecuentes de c-Kit con frecuencia muestran un patrón de crecimiento lentiginoso, caracterizado por melanocitos alineados como células individuales a lo largo de la epidermis en la etapa de progresión precedente al crecimiento invasivo. Por el contrario, los melanomas no CSD típicamente muestran un patrón de crecimiento pagetoide con melanocitos dispersos por toda la epidermis.

Ejemplo 2

Análisis de mutaciones SHP2

Métodos

Se estudiaron 104 melanomas primarios de melanoma de la mucosa (n = 35), piel acral (n = 24), de piel con daño crónico inducido por el sol (n = 16) y sin éste (n = 12) y ocular (n = 16). El daño inducido por el sol se definió microscópicamente por la presencia o la ausencia de elastosis solar marcada. Estos casos son parte de un conjunto de datos previamente publicado (Maldonado, et al. *J. Natl. Canc. Inst.* 95: 1878-1880, 2003; Curtin, et al., *New Engl. J. Med.* 353: 2135-2147, 2005). También, los inventores estudiaron 13 líneas celulares.

El ADN para el análisis de mutación se extrae de tumores primarios embebidos en parafina fijados en formol y de tejido normal circundante, ya publicados (Bastian, et al: *Cancer Res.* 8: 2170-2175, 1998). Se realizó el análisis de secuencia por secuenciación directa de productos de PCR amplificados generados con cebadores específicos diseñados para incluir los exones de interés. Los cebadores usados fueron como sigue (SEQ ID NOs: 6-21):

exón 3a: 5'-gtaaaatccgacgtggaagatg-3' (directo) y 5'-gttcagaggttagatctgcacagt-3' (inverso);

exón 3b: 5'-gaaatggagctgtcaccacatc-3' (directo) y 5'-catacagaccgtcatgcattt-3' (inverso);

exón 4a: 5'-ttgtgaaagaacaacatgaacc-3' (directo) y 5'-gacttgccgtcattgctctc-3' (inverso);

exón 4b: 5'-ggaaaacatgtagtttctgtacg-3' (directo) y 5'-tgaatgtaatggtctgtcttctg-3' (inverso);

exón 7: 5'-gtaatgctgatccaggctt-3' (directo) y 5'-ccctgaggaaaggtacagagg-3' (inverso);

exón 8: 5'-gctggggagtaactgatttga-3' (directo) y 5'-cttcaggacatgaggaagg-3' (inverso);

exón 13a: 5'-gtccactaaaagttgtgcattaaaca-3' (directo) y 5'-caggctgttacctgctcttc-3' (inverso);

exón 13b: 5'-catgatgttctctctgtagtg-3' (directo) y 5'-ctcctgctcaaaggagagc-3' (inverso).

Para los propósitos de secuenciación, un cebador M13 directo (5'-tgtaaacgacggccagt-3'; SEQ ID NO: 22) e inverso (5'-agcggataacaatttcacacagg-3'; SEQ ID NO: 23) se añadieron en los extremos 5' terminal de cada cebador directo e

inverso, respectivamente. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes. Una desnaturalización inicial a 95°C durante 6 minutos fue seguida por diez ciclos de 95°C durante 90 segundos, una fase de hibridación a 62°C durante 90 segundos, disminuyendo en 0,5°C cada ciclo de la toma de contacto a 57°C y una etapa de elongación de 72°C, durante 90 segundos. Esto fue seguido por 36 ciclos adicionales como se describe anteriormente con una temperatura de hibridación de 57°C y finalmente una etapa de elongación a 72°C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se purificaron usando ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, Ohio) y se secuenciaron directamente con los cebadores M13 utilizando un ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

El SHP2 (también conocido como PTPN11) codifica la proteína fosfatasa tirosina tipo no receptora, la región de homología de Src 2-dominio fosfatasa-2 (SHP-2) y funciona como un transductor de señal intracelular que se asocia con los receptores de tirosina quinasa y los adaptadores de la estructura (Tartaglia y Gelb, *Ann. Rev. Genom. and Hum. Gen.* 6: 45-68, 2005). Los inventores han secuenciado los exones 3, 7, 8 y 13 en 104 tumores de melanoma primario y 13 líneas celulares de melanoma y el exón 4 en 50 melanomas primarios y observaron tres mutaciones, lo que resulta en un P491L, S150F, y la sustitución de 1309V, respectivamente, ambos de los cuales se producen en el dominio de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). Fueron encontrados en un melanoma en la piel dañada por el sol crónicamente (CSD) y en el melanoma de mucosal, respectivamente, y se demostró que eran adquiridos somáticamente por la secuenciación del ADN a partir del tejido normal adyacente.

La sustitución de P491L (Binder, et al, *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5377-5381, 2005) ha sido encontrada en la línea germinal en pacientes con síndrome de Noonan y ha sido somáticamente adquirida en todos (Tartaglia, et al., *Blood*. 104: 307-313, 2004). La mutación 1309V en la línea germinal también se ha observado en el síndrome de Noonan (Tartaglia, et al., *Am. J. Hum. Gen.* 70: 1555-1563, 2002). También se publicaron mutaciones somáticas y de línea germinal que resultan en las sustituciones P491L y P491S y mutaciones de la línea germinal que resultan en una sustitución 1309V en un estudio que examinaba a pacientes, ya sea con el síndrome de Noonan o con él de Leopard (Tartaglia, et al., *Am J Hum Genet.* 78: 279-290, 2006). El S150F no ha sido previamente publicado. Se ha publicado anteriormente una mutación que resulta en una mutación R138Q en SHP2 en una muestra de melanoma (Bentires-Alj, et al, *Cancer Res.* 64: 8816-8820, 2004).

La proteína SHP2 consiste en un dominio N-SH2, PTP y C-SH2. Aunque el mecanismo exacto de la función de SHP2 no está completamente claro, se propone que, en su estado inactivo, el dominio de N-SH2 bloquee el sitio catalítico de PTP. La unión de SHP2 a su ligando activa la fosfatasa mediante el cambio de la conformación del dominio N-SH2 resultando en su disociación del dominio PTP (Tartaglia y Gelb, *Ann. Rev. Genom. and Hum. Gen.* 6: 45-68, 2005). Tanto los restos 1309 como P491 se encuentran en el dominio de PTP. En su estado inactivo, la proteína SHP2 es inactiva debido a las interacciones entre el dominio PTP y N-SH2. Las pruebas de la estructura cristalina indican que el resto P491 está espacialmente lejos de las superficies de interacción N-SH2/PTP. Ambos restos 1309 y P491, se cree que contribuyen a la estructura general PTP y no se piensa que desempeñan un papel en la función catalítica o en las interacciones N-SH2/PTP (Tartaglia, et al., *Am J Hum Genet.* 78: 279-290, 2006).

SHP2 controla positivamente la activación de la cascada RAS/MAPK (Cunnick, et al., *J. Biol. Chem.* 277: 9498-9504, 2002; Maroun, et al., *Mol. Cell. Biol.* 20: 8513-8525, 2000; Shi, et al., *Mol. Cell. Biol.* 20: 1526-1536, 2000; Saxton, et al, *EMBO J.* 16: 2352-2364, 1997). La ruta MAPK está desregulada en JMML debido a las mutaciones en NRAS, KRAS2 o NF1 en aproximadamente el 40% de los casos. Un análisis genético de SHP2 en 62 pacientes con JMML sin síndrome de Noonan mostró que el 34% de los pacientes JMML tenían mutaciones en SHP2. Complementando estos datos con el estado de mutación de otros componentes de la ruta MAPK mostrada, las mutaciones de SHP2 eran mutuamente excluyentes de otras mutaciones de la ruta MAPK que soportan un papel de activación de la ruta MAPK para SHP2 (Tartaglia, et al., *Nat Genet.* 34: 148-150, 2003).

En los 104 melanomas primarios analizados en este ejemplo, dos pacientes tenían mutaciones en los SHP2. Ningún paciente tenía mutaciones en otros componentes de la cascada MAPK examinada, la mutación de BRAF, FANR, KIT o el número de copia anormal de KIT. El análisis de los datos CGH publicados (Curtin, et al., *New Engl. J. Med* 353: 2135-2147, 2005) en el conjunto de datos de los inventores demostró que la muestra CSD mutada perdía una copia del locus SHP2 y que el alelo perdido reconoce el alelo de tipo salvaje como se indica por la altura del pico de las trazas de secuenciación (Figura 4).

En general, hay una distribución distinta de las mutaciones en SHP2 en pacientes con síndrome de Noonan o Leopard o JMML, AML, lo que indica que las diferentes mutaciones dan lugar a fenotipos diferentes. Las mutaciones de SHP2 en JMML que son sin Noonan asociado, no se encuentran en la línea germinal, lo que indica que esta mutación puede ser letal. En contraste, las mutaciones somáticas en SHP2 que resultan en el síndrome de Noonan, pero que no son leucomogénicas pueden tener una ganancia de función más suave. Los autores especularon que el síndrome de Noonan/mutantes JMML tienen efectos intermedios, lo que puede explicar el curso más leve de la leucemia mielomonocítica juvenil cuando se produce en pacientes con síndrome de Noonan. Los individuos con síndrome de Noonan que desarrollan leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) tienen mutaciones de la línea germinal en SHP2 en 5/7 de los casos, 4 de estos tienen mutaciones que resultan en una sustitución Thr73Ile mientras que esta sustitución se produce en sólo el 4% de los pacientes con síndrome de Noonan (Tartaglia, et al., *Nat Genet.* 34: 148-150, 2003).

Las mutaciones identificadas en las dos muestras de melanoma, como se describe en este ejemplo, se conocen que son alteraciones causantes de enfermedades que se encuentran en síndromes y cánceres con la activación de la ruta MAPK. La observación de los inventores de que estas mutaciones se producen en melanomas sin activaciones adicionales en la ruta MAPK sugiere que la mutación SHP2 proporciona un mecanismo alternativo de la activación de MAPK en el melanoma. En condiciones fisiológicas normales, la ruta MAPK puede ser activada por la unión del factor de células madre (SCF) al KIT de quinasa tirosina receptora, lo que da como resultado la dimerización de KIT y, por lo tanto, la activación de su actividad de proteína quinasa (Roskoski, Biochem. Biophys. Res. Comm. 337: 1-13, 2005). Esto da como resultado la autofosforilación de KIT en los restos de tirosina que son los sitios de conexión para las moléculas de transducción de señales que contienen los dominios SH2. El SHP2 se sabe que se une a la fosfotirosina 568 de KIT (Roskoski, Biochem. Biophys. Res. Comm. 337: 1-13, 2005). En los melanomas, KIT muta con frecuencia en tumores sin mutación de BRAF (Curtin, et al, J Clin Oncol 24: 4340-4346, 2006), resultando en la activación de MAPK. Los cánceres con mutaciones en la región yuxta-membrana de KIT son sensibles a Imatinib (Heinrich, et al., J Clin Oncol. 21: 4342-4349, 2003; Frost, et al, Mol Canc Therap 1: 1115-1124, 2002; Ma, et al, Blood 99: 1741-1744, 2002), ya que se espera que estas mutaciones promuevan la dimerización de KIT en ausencia de SCF, lo que resulta en su activación constitutiva (Lennartsson, et al, Oncogene 18: 5546-5553, 1999), o para evitar que KIT se mantenga en su conformación auto-inhibida (Mol, et al., J. Biol. Chem. 279: 31655-31663, 2004). El Imatinib impide la autofosforilación de KIT (Heinrich, et al, Blood 96: 925-932, 2000), lo que indica un efecto terapéutico para agentes tales como el Imatinib para los tumores con mutaciones SHP2, ya que su sitio de acoplamiento en KIT no se autofosforilará y, por lo tanto, SHP2 será incapaz de activar positivamente la ruta MAPK.

Los ejemplos anteriores se proporcionan a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Tabla 1

	Nº. de BRAF mutado (%)	Nº. de RAS mutado (%)	Nº. de KIT mutado (%)	Nº. con aumento de número de copias de Kit (%)
No CSD	22/33 (67)	8/33 (24)	3/18 (0)	0/36 (0)
CDS	3/26 (12)	4/26 (15)	4/19 (21)	1/29 (3)
Mucosal	2/31 (6)	1/30 (3)	8/37 (22)	10/33 (30)
Acral	6/31 (19)	3/31 (10)	3/29 (10)	6/34 (18)

Tabla 2

Código	Tipo	Número de copia Kit	Mutación Kit	Inmunohistoquímica
20	acral	Amp	peso	nd
AM108	acral	Amp	peso	positivo
AM107	acral	Enh	peso	nd
AM126	acral	Enh	peso	positivo ¹
AM130	acral	enh	peso	positivo
AM112	acral	normal	peso	nd
AM169	acral	normal	Y553N	positivo ¹
AM17	acral	normal	R634W	positivo
AM60	acral	normal	K642E y BRAF	positivo
AM141	mucosal	amp	K642E	positivo
AM148	mucosal	amp	K642E	positivo
AM218	mucosal	amp	peso	positivo ¹
AM210	mucosal	amp	K642E y N566D	positivo

ES 2 577 535 T3

AM120	mucosal	enh	peso	positivo
AM209	mucosa	enh	peso	positivo
AM157	mucosal	enh	peso	nd
AM147	mucosal	enh	peso	positivo ¹
AM143	mucosal	enh	peso	positivo
AM124	mucosal	enh	peso	nd
AM223	mucosal	Normal	V559A	positivo
AM219	mucosal	na	V559A	positivo
AM207	mucosal	na	L576P	positivo
AM220	mucosal	na	L576P	positivo
AM150	mucosal	normal	D816H	positivo
111	CDS	amp	peso	nd
53	CDS	normal	L576P	nd
Mx41	CDS	normal	D816H	nd
18	CDS	normal	A829P	nd
57	CDS	normal	eliminación intrónica/NRAS	nd

enh: aumento del no. de copias; amp: amplificador; nd: no disponible; CSD: daño solar crónico

¹Tinción de CD117 realizada a una concentración de 1/25 durante 60 minutos

Tabla 3

Mutación Kit	Nº. de mutaciones	Dominio afectado	La mutación de la enfermedad se reporta en:
K642E	4	JMD ¹	tumor de células germinales
L576P	3	JMD	GIST
D816H	2	quinasa	AML, tumor de células germinales
V559A	2	JMD	GIST
A829P	1	quinasa	nuevo
eliminación intrónica	1	JMD	nuevo
R634W	1		nuevo
Y553N	1	JMD	nuevo pero muchas mutaciones en 550-556 en GIST
N566D	1	JMD	GIST (N566G)

JMD es yuxtamembrana

- 5 ¹el resto se encuentra fuera de la JMD, pero se sabe que la mutación desestabiliza el JMD a través de interacciones de aminoácidos

ES 2 577 535 T3

SEQ ID NO: 1 Secuencia de ácidos nucleicos de KIT humana ejemplar CDS 22-2952

1 gatcccatcg cagctaccgc gatgagagge gctcgcggcg cctgggattt tctctgcggt
61 ctgctcctac tgcttgcggt ccagacagge tcttctcaac catctgtgag tccaggggaa
121 ccgtctccac catccatcca tccaggaana tcagacttaa tagtccgcgt gggcgacgag
181 attaggctgt tatgcactga tccgggcttt gtcaaatgga cttttgagat cctggatgaa
241 acgaatgaga ataagcagaa tgaatggatc acggaaaagg cagaagccac caacaccggc
301 aaatacacgt gcaccaacaa acacggctta agcaattcca tttatgtggt tggtagagat
361 cctgccaaagc ttttccttgt tgaccgctcc ttgtatggga aagaagacaa cgacacgctg
421 gtccgctgtc ctctcacaga ccagaagtg accaattatt ccctcaaggg gtgccagggg
481 aagcctcttc ccaaggactt gaggtttatt cctgaccca aggcgggcat catgatcaaa
541 agtgtgaaac ggcctacca tcggctctgt ctgcattggt ctgtggacca ggagggcaag
601 tcagtgtgtg cggaaaaatt catcctgaaa gtgaggccag ccttcaaagc tgtgcctggt
661 gtgtctgtgt ccaaagcaag ctatcttctt agggaagggg aagaattcac agtgacgtgc
721 acaataaaag atgtgtctag ttctgtgtac tcaacgtgga aaagagaaaa cagtcagact
781 aaactacagg agaaatataa tagctggcat cacggtgact tcaattatga acgtcaggca
841 acgttgacta tcagttcagc gagagttaat gattctggag tgttcatgtg ttatgccaat
901 aatacttttg gatcagcaaa tgtcacaaca accttggag tagtagataa aggattcatt
961 aatatcttcc ccatgataaa cactacagta tttgtaaacg atggagaaaa tgtagatttg
1021 attggtgaat atgaagcatt ccccaaact gaacaccagc agtggatcta tatgaacaga
1081 accttactg ataaatggga agattatccc aagtctgaga atgaaagtaa tatcagatac
1141 gtaagtgaac ttcactaac gagattaaaa ggcaccgaag gaggcactta cacattccta
1201 gtgtccaatt ctgacgtcaa tgctgccata gcatttaatg tttatgtgaa taaaaacca
1261 gaaatcctga cttacgacag gctcgtgaat ggcattgctc aatgtgtggc agcaggattc
1321 ccagagccca caatagattg gtatTTTTTgt ccaggaactg agcagagatg ctctgcttct

ES 2 577 535 T3

1381 gtactgccag tggatgtgca gacactaaac tcactctgggc caccgtttgg aaagctagtg
 1441 gttcagagtt ctatagattc tagtgcattc aagcacaatg gcacggttga atgtaaggct
 1501 tacaacgatg tgggcaagac ttctgcctat tttaactttg catttaaagg taacaacaaa
 1561 gagcaaatcc atccccacac cctgttcact cctttgctga ttggtttctg aatcgtagct
 1621 ggcatgatgt gcattattgt gatgattctg acctacaaat atttacagaa acccatgtat
 1681 gaagtacagt ggaaggttgt tgaggagata aatggaaaca attatgttta catagacca
 1741 acacaacttc cttatgatca caaatgggag tttcccagaa acaggtgag ttttgggaaa
 1801 accctgggtg ctggagcttt cgggaagggt gttgaggcaa ctgcttatgg cttaattaag
 1861 tcagatgagg ccatgactgt cgctgtaaag atgctcaagc cgagtgccca tttgacagaa
 1921 cgggaagccc tcactgtctga actcaaagtc ctgagttacc ttggtaatca catgaatatt
 1981 gtgaatctac ttggagcctg caccattgga gggcccaccc tggtcattac agaatattgt
 2041 tgctatggtg atcttttgaa ttttttgaga agaaaacgtg attcatttat ttgttcaaag
 2101 caggaagatc atgcagaagc tgcactttat aagaatcttc tgcattcaaa ggagtcttcc
 2161 tgcagcgata gtactaatga gtacatggac atgaaacctg gagtttctta tgttgcacca
 2221 accaaggccg acaaaaaggag atctgtgaga ataggctcat acatagaaag agatgtgact
 2281 cccgccatca tggaggatga cgagttggcc ctgacttag aagacttgct gagcttttct
 2341 taccaggtgg caaagggcat ggctttcctc gcctccaaga attgtattca cagagacttg
 2401 gcagccagaa atatcctcct tactcatggt cggatcacia agatttgtga ttttgggtcta
 2461 gccagagaca tcaagaatga ttctaattat gtggttaaag gaaacgctcg actacctgtg
 2521 aagtggatgg cacctgaaag cttttcaac tgtgtataca cgtttgaaag tgacgtctgg
 2581 tcctatggga tttttctttg ggagctgttc tctttaggaa gcagccccta tcctggaatg
 2641 ccggtcgatt ctaagttcta caagatgatc aaggaaggct tccggatgct cagccctgaa
 2701 cacgcacctg ctgaaatgta tgacataatg aagacttgct gggatgcaga tcccctaaaa
 2761 agaccaacat tcaagcaaat tgttcagcta attgagaagc agatttcaga gagaccaat
 2821 catatttact ccaacttagc aaactgcagc cccaaccgac agaagcccgt ggtagaccat
 2881 tctgtgcgga tcaattctgt eggcagcacc gcttcctcct ccagcctct gcttgtgcac
 2941 gacgatgtct gagcagaatc agtgtttggg tcaccctcc agaatgatc tcttcttttg
 3001 gcttccatga tggttatfff cttttctttc aacttgcac ccaactccagg atagtgggca

ES 2 577 535 T3

3061 cccactgca atcctgtcct tctgagcaca ctttagtggc cgatgatttt tgtcatcagc
 3121 caccatccta ttgcaaaggt tccaactgta tatattccca atagcaacgt agcttctacc
 3181 atgaacagaa aacattctga tttggaaaaa gagagggagg tatggactgg gggccagagt
 3241 cctttccaag gcttctccaa ttctgcccaa aaatatgggt gatagtttac ctgaataaat
 3301 ggtagtaatc acagttggcc ttcagaacca tccatagtag tatgatgata caagattaga
 3361 agctgaaaac ctaagtcctt tatgtggaaa acagaacatc attagaacaa aggacagagt
 3421 atgaacacct gggcttaaga aatctagtat ttcattgctgg gaatgagaca taggccatga
 3481 aaaaaatgat cccaagtgt gaacaaaaga tgctcttctg tggaccactg catgagcttt
 3541 tatactaccg acctggtttt taaatagagt ttgctattag agcattgaat tggagagaag
 3601 gcctccctag ccagcacttg tatatacgca tctataaatt gtccgtgttc atacatttga
 3661 ggggaaaaca ccataagggt tcgtttctgt atacaaccct ggcattatgt cactgtgta
 3721 tagaagtaga ttaagagcca tataagtttg aaggaaacag ttaataccat tttttaagga
 3781 aacaatataa ccacaaagca cagtttgaac aaaatctcct cttttagctg atgaacttat
 3841 tctgtagatt ctgtggaaca agcctatcag cttcagaatg gcattgtact caatggattt
 3901 gatgctgttt gacaaagtta ctgattcact gcatggctcc cacaggagtg ggaaaacact
 3961 gccatcttag tttggattct tatgtagcag gaaataaagt ataggtttag cctccttcgc
 4021 aggcattgtc tggacaccgg gccagtatct atatatgtgt atgtacgttt gtatgtgtgt
 4081 agacaaatat ttggaggggt atttttgccc tgagtccaag agggtccttt agtacctgaa
 4141 aagtaacttg gctttcatta ttagtactgc tcttgtttct tttcacatag ctgtctagag
 4201 tagcttacca gaagcttcca tagtggtgca gaggaagtgg aaggcatcag tccctatgta
 4261 tttgcagttc acctgcactt aaggcactct gttattttaga ctcatcttac tgtacctggt
 4321 ccttagacct tccataatgc tactgtctca ctgaaacatt taaattttac cctttagact
 4381 gtagcctgga tattattcct gtagtttacc tctttaaaaa caaaacaaaa caaaacaaaa
 4441 aactcccctt cctcactgcc caatataaaa ggcaaagtgt tacatggcag agtttgtgtg
 4501 ttgtcttgaa agattcaggt atgttgctt tatggtttcc cccttctaca tttcttagac
 4561 tacattttaga gaactgtggc cgttatctgg aagtaacat ttgcactgga gttctatgct
 4621 ctgcacactt tccaaagtta acagattttg gggttgtgtt gtcaccaag agattgtgtg
 4681 ttgccatact ttgtctgaaa aattcctttg tgtttctatt gacttcaatg atagtaagaa

ES 2 577 535 T3

4741 aagtggttgt tagttataga tgtctaggta cttcaggggc acttcattga gagttttgtc
4801 ttgccatact ttgtctgaaa aattcctttg tgtttctatt gacttcaatg atagtaagaa
4861 aagtggttgt tagttataga tgtctaggta cttcaggggc acttcattga gagttttgtc
4921 aatgtctttt gaatattccc aagcccatga gtccttgaaa atatttttta tatatacagt
4981 aactttatgt gtaaatacat aagcggcgta agtttaaagg atggttggtg tccacgtgtt
5041 ttattcctgt atggttgcca attggtgaca gttctgaaga attc

SEQ ID NO: 2 Secuencia de polipéptidos humana de c-Kit ejemplar

1 mrgargawdf lcvlllllrvt qtgssqpsvs pgepsppsih pgksdlivrv gdeirllctd
61 pgfvkwtfei ldetnenkqn ewitekaeat ntgkytctnk hglnsniyvf vrdpaklflv
121 drslygkedn dtlvrcpltd pevtnyslkg cggkplpkdl rfipdpkagi miksvkrayh
181 rlclhcsvdq egksvlsekf ilkvrpafka vpvsvskas yllregeeft vtctikdvss
241 svystwkren sqtklqekyn swvhgdfnye rqatltissa rvndsgvfmc yanntfgsan
301 vtttleavdk gfinifpmin ttvfvndgen vdliveyeaf pkpehqwiwy mnrtftdkwe
361 dypksenesn iryvselhlt rlkgteggty tflvsnsdvn aaiafnvyvn tkpeiltydr
421 lvngmlqcva agfpeptidw yfcpgteqrc sasvlpvdvq tlnssgppfg klvqssids
481 safkhngtve ckayndvgkt sayfnfafkg nnkeqihpht lftplligfv ivagmmciiv
541 miltykylqk pmyevqwkvv eeingnnyvy idptqlpydh kwefprnrls fgktlgagaf
601 gkvveatayg liksdaamtv avkmlkpsah lterealmse lkvlsylgnh mnivnllgac
661 tiggptlvit eyccygdltn flrrkrdsfi cskqedhaea alyknllhsk esscsdstne
721 ymdmkpgvsy vvptkadkrr svrigsyier dvtpaimedd elaldledll sfsyqvakgm
781 aflaskncih rdlaarnill thgritkicd fglardiknd snyvkvgnar lpvkwmapes
841 ifncvytfes dvwsygiflw elfslgsspy pgmpvdskfy kmikegfrml spehapaemy
901 dimktcwwad plkrptfkqi vqliekqise stnhiysnla ncsprnqkpv vdhsvrinsv
961 gstasssqpl lvhddv

SEQ ID NO: 3 Secuencia de ácidos nucleicos de SHP2 humana ejemplar NM_002834

ES 2 577 535 T3

1 atgacatcgc ggagatgggt tcacccaaat atcactgggtg tggaggcaga aaacctactg
 61 ttgacaagag gagttgatgg cagttttttg gcaaggccta gtaaaagtaa ccctggagac
 121 ttcacacttt ccgttagaag aatggagct gtcaccaca tcaagattca gaacactggg
 181 gattactatg acctgtatgg aggggagaaa tttgccactt tggctgagtt ggtccagtat
 241 tacatggaac atcacgggca attaaaagag aagaatggag atgtcattga gcttaaatat
 301 cctctgaact gtgcagatcc tacctctgaa aggtggtttc atggacatct ctctgggaaa
 361 gaagcagaga aattattaac tgaaaaagga aaacatggta gttttcttgt acgagagagc
 421 cagagccacc ctggagattt tgttctttct gtgcgactg gtgatgacaa aggggagagc
 481 aatgacggca agtctaaagt gacccatggt atgattcgct gtcaggaact gaaatacgac
 541 gttggtggag gagaacgggt tgattctttg acagatcttg tggaacatta taagaagaat
 601 cctatggtgg aaacattggg tacagtacta caactcaagc agccccttaa cacgactcgt
 661 ataaatgctg ctgaaataga aagcagagtt cgagaactaa gcaaattagc tgagaccaca
 721 gataaagtca aacaaggctt ttgggaagaa tttgagacac tacaacaaca ggagtgcaaa
 781 cttctctaca gccgaaaaga ggggtcaaagg caagaaaaca aaaacaaaaa tagatataaa
 841 aacatcctgc cttttgatca taccaggggt gtcctacacg atggtgatcc caatgagcct
 901 gtttcagatt acatcaatgc aatatcatc atgcctgaat ttgaaacca gtgcaacaat
 961 tcaaagccca aaaagagtta cattgccaca caaggctgcc tgcaaaacac ggtgaatgac
 1021 ttttgccgga tgggtgtcca agaaaactcc cgagtgattg tcatgacaac gaaagaagtg
 1081 gagagaggaa agagtaaagtg tgtcaaacac tggcctgatg agtatgctct aaaagaatat
 1141 ggcgtcatgc gtgttaggaa cgtcaaagaa agcgcgctc atgactatac gctaagagaa
 1201 cttaaacttt caaaggttgg acaagggat acggagagaa cggctctggca ataccacttt
 1261 cggacctggc cggaccacgg cgtgcccagc gaccctgggg gcgtgctgga cttcctggag
 1321 gaggtgcacc ataagcagga gagcatcatg gatgcagggc cggctcgtggg gactgcagt
 1381 gctggaattg gccggacagg gacgttcatt gtgattgata ttcttattga catcatcaga
 1441 gagaaagggtg ttgactgcga tattgacggt cccaaaacca tccagatggg gcggctctcag
 1501 aggtcagggg tgggtccagac agaagcacag taccgattta tctatatggc ggtccagcat
 1561 tatattgaaa cactacagcg caggattgaa gaagagcaga aaagcaagag gaaagggcac
 1621 gaatatacaa atattaagta ttctctagcg gaccagacga gtggagatca gagccctctc
 1681 ccgccttgta ctccaacgcc accctgtgca gaaatgagag aagacagtgc tagagtctat
 1741 gaaaacgtgg gcctgatgca acagcagaaa agtttcagat ga

SEQ ID NO: 4 Secuencia de polipéptidos de SHP2 humana ejemplar

1 mtsrrwfhpn itgveaenll ltrgvdgsfl arpsksnpgd ftlsvrrnga vthikiqntg
61 dyydlyggek fatlaelvqy ymehhgqlke kngdvielky plncadptse rwfhghlsgk
121 eaeklltekg khgsflvres qshpgdfvls vrtgddkges ndgkskvthv mircqelkyd
181 vgggerfds1 tdlvehykkn pmvetlgtvl qlkqplnttr inaaeiesrv relsklaett
241 dkvkqgfwee fetlqqqeck llysrkegqr qenknknryk nilpfdhtrv vlhdgdpnep
301 vsdyinanii mpefetkcnn skpkksyiat qgclqntvnd fwrvmvfgens rvivmttkev
361 ergkskcvky wpdeyalkey gvmrvrnvke saahdytlre lklskvgqgn tertvwqyhf
421 rtwpdhgvps dpggvldfle evhkhqesim dagpvvvhcs agigrtgtfi vidilidiir
481 ekgvdcdidv pktiqmvrsg rsgmvqteaq yrfiymavqh yietlqrrie eeqskkrkgh
541 eytnikysla dqtsgdqspl ppctptppca emredsarvy envglmqqqk sfr

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar células de melanoma dependiente de c-KIT en una muestra biológica que comprende células de melanoma de un paciente que tiene un melanoma que surgió de piel acral u ocular, opcionalmente conjuntival, o piel con daño crónico inducido por el sol (CSD), comprendiendo el método:
- 5 detectar la presencia o ausencia de una mutación en células de melanoma en la muestra biológica, donde la mutación es:
- i) una mutación de secuencia en un gen de c-KIT, o
- ii) un aumento en el número de copias en un gen de c-KIT;
- 10 en donde la presencia de la mutación es indicativa de la presencia de células de melanoma dependiente de c-KIT.
2. El método de la reivindicación 1, en el que:
- (a) detectar la presencia o ausencia del aumento en el número de copias comprende poner en contacto una muestra de ácido nucleico de la muestra biológica con una sonda al gen de c-KIT bajo condiciones en las que la sonda se hibrida selectivamente al gen c-KIT, y determinar la presencia o
- 15 ausencia del aumento en el número de copias, en donde la etapa de poner en contacto se realiza opcionalmente en una hibridación in situ; o
- (b) detectar la presencia o ausencia del aumento en el número de copias del gen c-KIT en una muestra de ácido nucleico comprende una reacción de amplificación.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de detección comprende detectar la presencia o
- 20 ausencia de la mutación de secuencia en una proteína c-KIT, presente en la muestra biológica, que es codificada por el gen.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar una mutación de secuencia en el gen SHP2, opcionalmente en donde la mutación está en la región que codifica el dominio de la proteína tirosina fosfatasa y es opcionalmente una sustitución P491L, S150F o I309V.
- 25 5. Un método para determinar si un paciente con melanoma, que tiene un melanoma acral, un melanoma ocular, opcionalmente un melanoma conjuntival o un melanoma CSD es un candidato para recibir una terapia que inhiba la actividad de c-Kit, comprendiendo el método detectar si el melanoma, que el paciente tiene, comprende células de melanoma que tienen un aumento en el número de copias de c-KIT o una mutación de secuencia en c-Kit.
6. El método de la reivindicación 1 ó 5, en donde la etapa de detección comprende detectar la presencia o
- 30 ausencia de una mutación de secuencia en un gen c-KIT presente en una muestra de ácido nucleico de la muestra biológica.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la etapa de detección comprende una reacción de amplificación.
8. El método de la reivindicación 6 ó 7, en donde la mutación de secuencia está en el exón 11, 13, 17 ó 18 de c-KIT; o la mutación de secuencia es K642E, L576P, D816H, V559A, A829P, una eliminación intrónica, R634W, Y553N y N566d.
- 35 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 ó 8, en donde la detección de la presencia o ausencia de la mutación de secuencia en el gen de c-KIT comprende la secuenciación de una parte del gen de c-KIT.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra biológica es una muestra de piel, o es una muestra de ojos, nodos linfáticos, pulmón, hígado, glándula suprarrenal o hueso.
- 40 11. Un método para detectar células de melanoma dependientes de c-Kit en una muestra biológica de un paciente que tiene un melanoma, comprendiendo el método:
- determinar que el melanoma surgió del conjuntivo; y
- detectar la sobreexpresión de c-KIT.
- 45 12. Un método para monitorizar la progresión de un melanoma en un paciente que tiene un melanoma acral, CSD, o un melanoma ocular, opcionalmente un melanoma conjuntival, candidato para recibir una terapia, comprendiendo el método detectar un cambio en el número de células de melanoma dependiente de c-KIT en una muestra biológica de un paciente, en donde un cambio en el número de células de melanoma dependiente de c-KIT, que tienen una mutación de secuencia en c-KIT, o un aumento en el número de copias del gen de c-KIT, es indicativo de la respuesta del paciente a la terapia.

13. El método de la reivindicación 12, en donde las células de melanoma dependiente de c-KIT tienen una mutación de secuencia en c-KIT, y además en donde la mutación de secuencia está en el exón 11, 13, 17 ó 18 o en donde la mutación de secuencia es K642E, L576P, D816H, V559A, A829P, una eliminación intrónica, R634W, Y553N y N566d.
- 5 14. El método de la reivindicación 12 ó 13, en donde la muestra biológica es de piel o de sangre.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el melanoma surgió de piel con daño crónico inducido por el sol.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el melanoma surgió de piel acral.
- 10 17. Un inhibidor de c-KIT para uso en un método para inhibir la proliferación de células de melanoma dependiente de c-KIT en un paciente que tiene un melanoma que surgió de melanoma acral, un melanoma ocular, opcionalmente un melanoma conjuntival, o un melanoma CSD, en donde las células de melanoma dependiente de c-KIT tienen una mutación de secuencia de c-KIT o un aumento en el número de copias de c-KIT, y en donde el inhibidor de c-KIT es un fármaco dirigido a tirosina quinasa del receptor de molécula pequeña o un anticuerpo anti-c-KIT.
- 15 18. El inhibidor de c-KIT para uso de acuerdo con la reivindicación 16, para uso en dicho método en donde las células de melanoma dependiente de c-KIT tienen una mutación de secuencia de c-KIT en el exón 11, 13, 17 ó 18.
19. El inhibidor de c-KIT para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde las células de melanoma dependiente de c-KIT tienen una mutación de secuencia de c-KIT, y además, en donde la mutación de secuencia es K642E, L576P, D816H, V559A, A829P, una eliminación intrónica, R634W, Y553N o N566D.
- 20 20. El uso de la presencia o ausencia de una mutación en células de melanoma en una muestra biológica de un paciente que tiene un melanoma que surgió de piel acral, ocular, opcionalmente conjuntival, o piel con daño crónico inducido por el sol (CSD), en donde la mutación es: i) una mutación de secuencia en un gen de c-KIT, o ii) un aumento en el número de copias en un gen de c-KIT; para detectar células de melanoma dependiente de c-KIT en la muestra biológica, en donde la presencia de la mutación es indicativa de la presencia de células de melanoma dependiente de c-KIT.
- 25

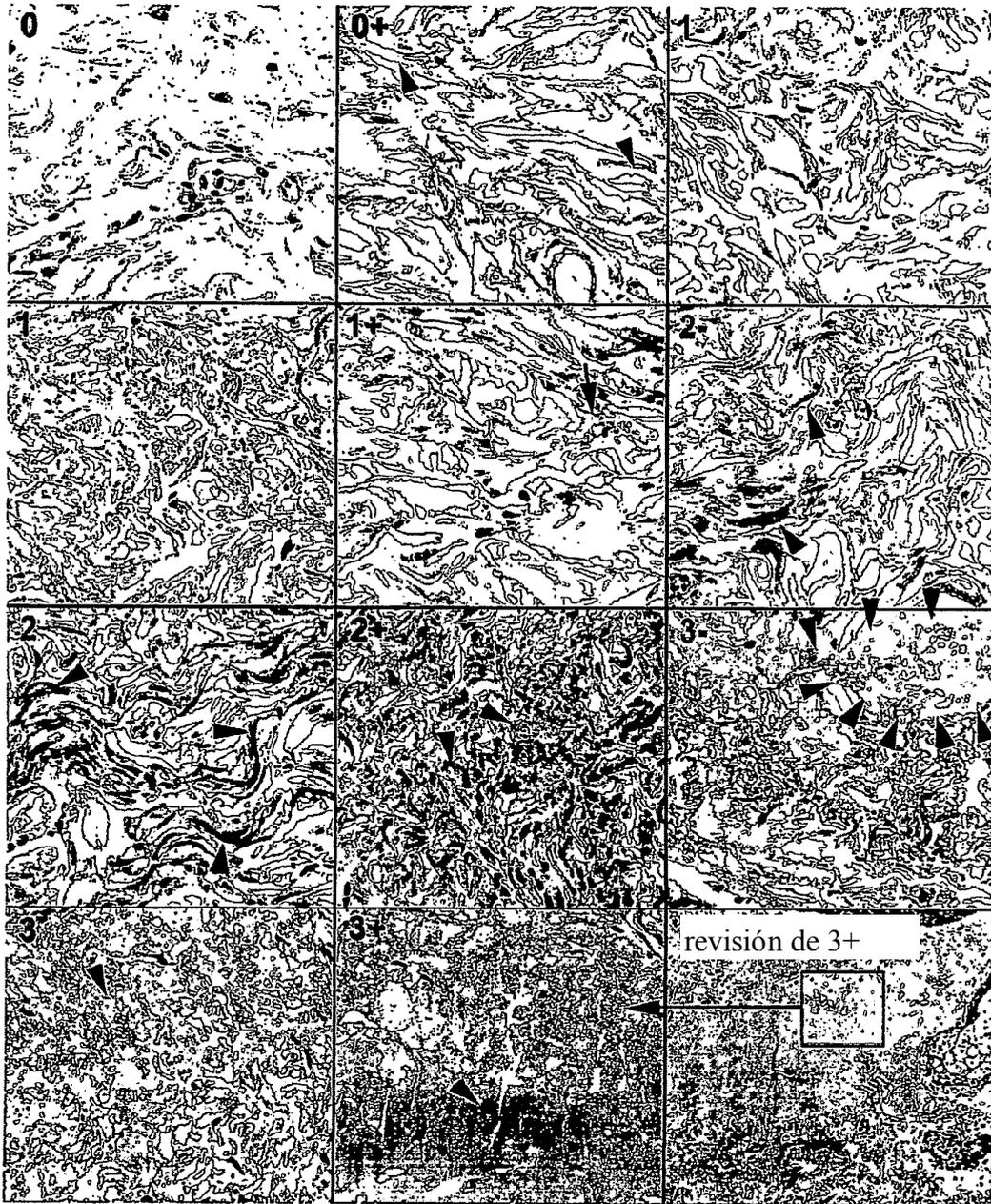


FIG. 1

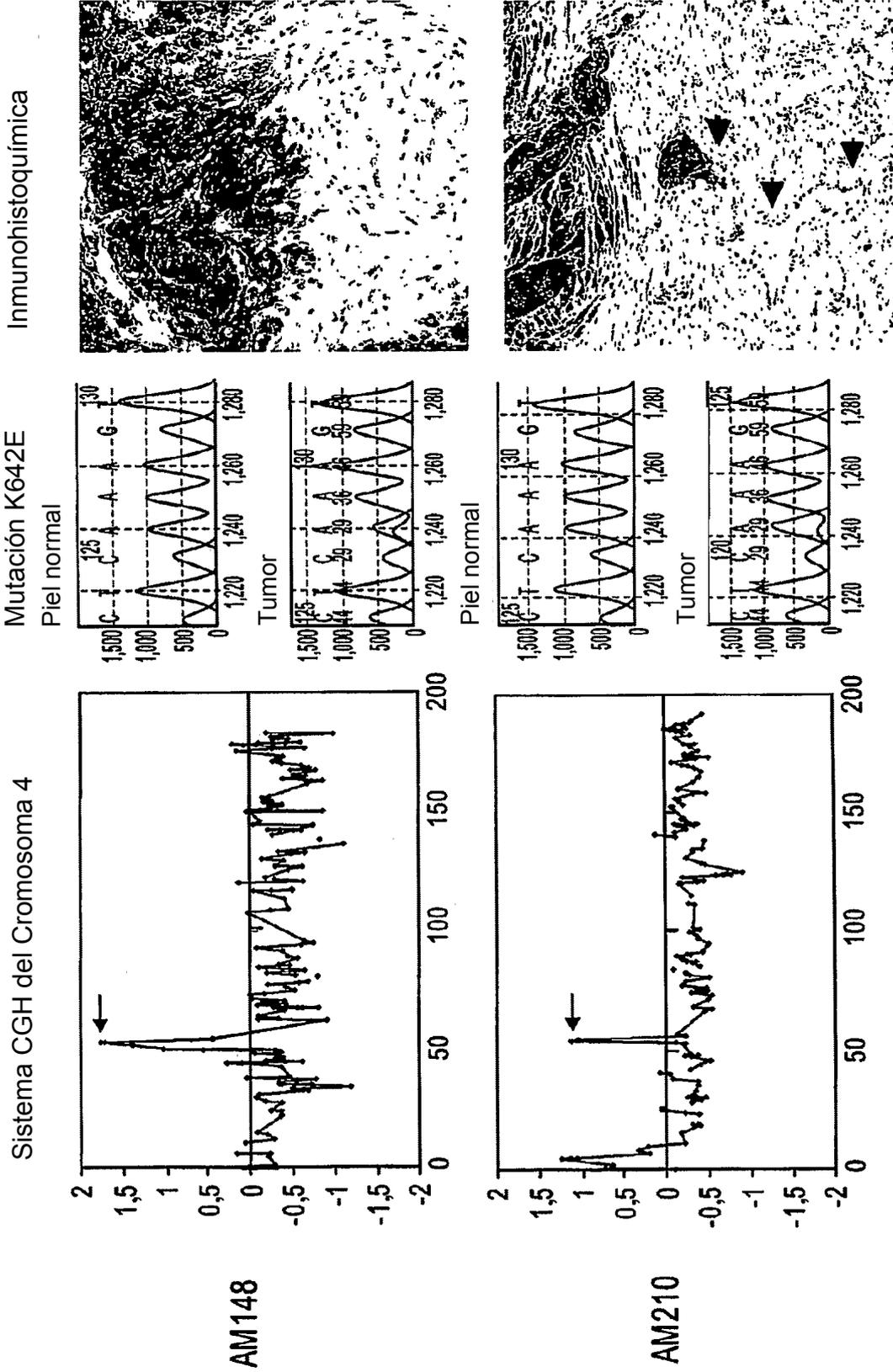


FIG. 2

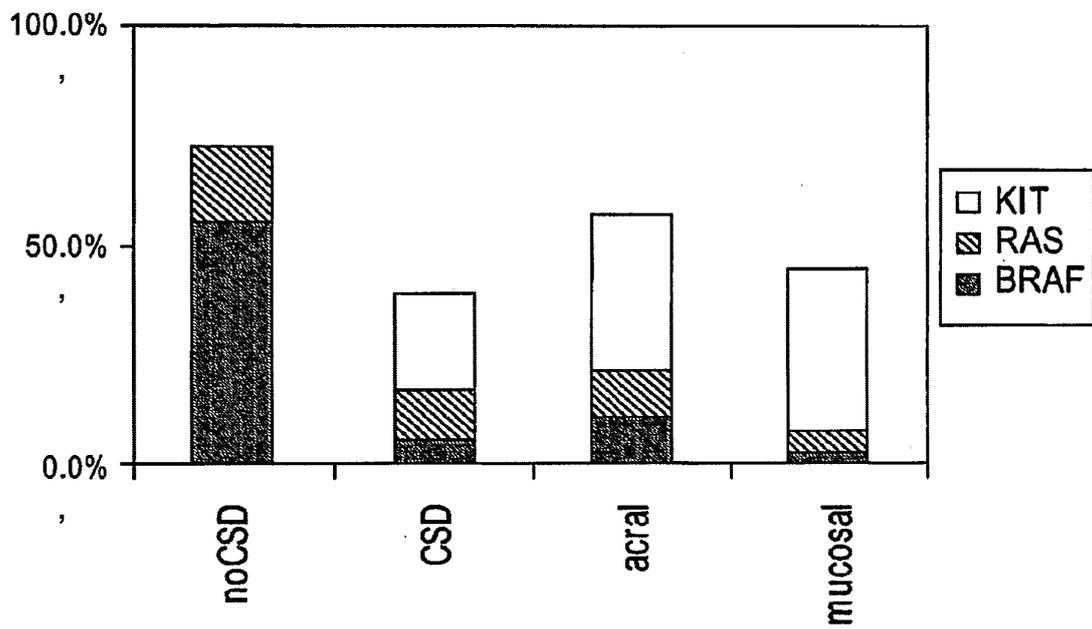


FIG. 3