

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 989**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2014 PCT/US2014/029986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2014 E 14764616 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2971129**

54 Título: **FALZ para su uso como diana para terapias para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361790153 P

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

19.06.2018

73 Titular/es:

**SUTTER BAY HOSPITALS (100.0%)
475 Brannan Street, Suite 130
San Francisco, CA 94107, US**

72 Inventor/es:

**KASHANI-SABET, MOHAMMED y
DAR, ALTAF, A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 989 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

FALZ para su uso como diana para terapias para tratar el cáncer

Campo técnico

5 La descripción proporciona métodos para el diagnóstico del melanoma, la prognosis y/o el avance del melanoma basándose en la medición de los niveles de expresión de FALZ. La descripción proporciona además agentes para su uso para tratar un sujeto con melanoma mediante la inhibición de la actividad y/o la expresión de FALZ.

Antecedentes

10 Los mecanismos epigenéticos, que incluyen las modificaciones postraduccionales de histonas, la metilación del ADN, la incorporación de variantes de histonas, y la remodelación de los nucleosomas, han evolucionado para regular la estructura de la cromatina y el acceso al ADN.

Sumario

15 El BPTF (factor de transcripción de los dedos de PHD del bromodominio; también denominado FALZ (antígeno de Alzheimer fetal)) es un gen cuyo papel preciso en la transformación neoplásica no está claro. La descripción demuestra que la expresión de FALZ es un marcador de pronóstico independiente para el melanoma primario y puede representar un biomarcador predictivo de la respuesta a una terapia dirigida en el melanoma. Además, la supresión de FALZ mediada por ARNhc produce un crecimiento significativamente disminuido de células de melanoma, glioblastoma, y cáncer de mama *in vitro* y/o *in vivo*, lo cual sugiere la potencial utilidad terapéutica de emplear FALZ en la terapia del melanoma, así como de otros tumores sólidos.

20 Grinberg-Rashi *et al.* (2009), *Clinical Cancer Research*, 15:1755-1761, demuestran que la expresión de tres genes, que incluyen FALZ, en cáncer de pulmón no microcítico está asociada con la propagación metastásica al cerebro. White *et al.* (2008), *FASEB J.*, 22, sugieren que nFAC1 puede modificar la expresión génica en tumores de mama, lo cual provoca la represión de la expresión normal de BRCA1 y contribuye a la carcinogénesis de mama. De Semir *et al.* (2012), *PNAS*, 109:7067-7072, describen el papel de la proteína de interacción con el dominio de homología de la pleckstrina (PHIP) en la predicción y la estimulación de la metástasis del melanoma y en la clasificación molecular del melanoma. El documento US 2010/145131 describe un método para predecir la metástasis del sistema nervioso central (SNC) de un cáncer no neuronal que comprende determinar el nivel y/o la actividad de la N-cadherina (CDH2) y opcionalmente comprende además determinar el nivel y/o la actividad del miembro de la familia de la quinesina C1 (KIFC1) y/o del antígeno del Alzheimer fetal (FALZ1).

30 La invención proporciona un método de prognosis del melanoma que comprende: (i) medir el nivel de BPTF en una muestra biológica obtenida de un sujeto sospechoso de padecer melanoma; (ii) comparar el nivel de BPTF en la muestra del sujeto con el nivel promedio de BPTF de una o más muestras biológicas control; (iii) proporcionar una prognosis que indique si el sujeto puede padecer melanoma basándose en que tenga un nivel menor o mayor de BPTF, en comparación con el nivel promedio de BPTF en los controles. En otra realización, la muestra biológica del sujeto procede de una biopsia de tejido. En otra realización, dichas una o más muestras biológicas control proceden de biopsias de tejido de nevi benignos. En otra realización, las muestras biológicas control comprenden muestras procedentes del sujeto. En otra realización, las muestras biológicas control comprenden muestras que no proceden del sujeto. En una realización, la descripción emplea un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo marcado que se une específicamente a un polipéptido o un polinucleótido de BPTF, respectivamente.

40 La invención proporciona un método para determinar si un sujeto padece melanoma que comprende: (i) medir el nivel de BPTF en una muestra biológica obtenida de un sujeto sospechoso de padecer melanoma; (ii) comparar el nivel de BPTF en la muestra del sujeto con el nivel promedio de BPTF de una o más muestras biológicas control; y (iii) determinar si el sujeto padece melanoma basándose en que tenga un nivel significativamente menor o mayor de BPTF, en comparación con el nivel promedio de BPTF en los controles. En otra realización, la muestra biológica del sujeto procede de una biopsia de tejido. En otra realización, dichas una o más muestras biológicas control proceden de biopsias de tejido de nevi benignos. En otra realización, las muestras biológicas control comprenden muestras procedentes del sujeto. En otra realización, las muestras biológicas control comprenden muestras que no proceden del sujeto. En una realización, la descripción emplea un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo marcado que se une específicamente a un polipéptido o un polinucleótido de BPTF, respectivamente.

50 La invención proporciona un método para determinar si un melanoma en un sujeto está avanzando o está en remisión, que comprende: (i) medir el nivel de BPTF en la muestra biológica obtenida del sujeto en un primer momento; (ii) medir el nivel de BPTF en una muestra del sujeto obtenida del sujeto en un segundo momento; (iii) comparar los niveles de BPTF del primer momento con los niveles del segundo momento; y (iv) determinar si el melanoma está avanzando o está en recuperación basándose en el cambio en los niveles de BPTF entre los dos momentos, en el que una disminución en los niveles de BPTF entre el primer momento y el segundo momento indica que el melanoma está en remisión, y en el que un aumento en los niveles de BPTF entre el primer momento y el segundo momento indica que el melanoma está avanzando. En otra realización, las muestras biológicas proceden de biopsias de tejido. En otra realización, si los niveles de BPTF aumentan entre el primer momento y el segundo

momento, se proporciona un agente inhibidor de BPTF para la administración al sujeto. En una realización, la descripción emplea un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo marcado que se une específicamente a un polipéptido o un polinucleótido de BPTF, respectivamente.

5 La invención también proporciona un agente para su uso para tratar el melanoma en un sujeto, y el agente es una cantidad eficaz de un ácido nucleico inhibidor de BPTF que inhibe la expresión de BPTF. El agente puede ser una molécula de ARNi. En otra realización, la inhibición de la expresión de BPTF provoca la inhibición o la prevención de la proliferación o migración de las células de melanoma. En otra realización, el agente para su uso según este aspecto se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos anticáncer adicionales. En otra realización, dichos uno o más agentes terapéuticos anticáncer adicionales se seleccionan del grupo que consiste en
10 análogos del platino, agentes alquilantes, sulfonatos de alquilo, andrógenos, antiadrenales, antiandrógenos, antibióticos, antiestrógenos, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromataza, antimetabolitos, análogos del ácido fólico, etiléniminas y metilamelaminas, reponedores del ácido fólico, gas mostaza, nitrosoureas, análogos de purina, análogos de pirimidina, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la timidilato sintasa, anticuerpos anticáncer, productos quimioterapéuticos, agentes de desmetilación, y agentes terapéuticos dirigidos. En otra realización, el agente para su uso según este aspecto es un vector que comprende un ácido nucleico inhibidor de BPTF. En otra
15 realización, el vector comprende un vector de expresión. En otra realización, el vector comprende un vector retroviral competente en la replicación.

20 La invención también proporciona una composición que comprende un inhibidor de BPTF que comprende un ARNi específico para el BPTF y un producto terapéutico anticáncer de primera línea para su uso en el tratamiento del melanoma.

La descripción proporciona una o más realizaciones indicadas en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

25 La figura 1A-F muestra los efectos de la supresión mediada por ARNh_c de la expresión de Bptf en el melanoma murino. A) Infrarregulación de la expresión de Bptf a nivel del ARNm por dos ARNh_c diferentes en células de melanoma murino B16-F10. B) Supresión de la proliferación celular después de la inactivación de Bptf. C-D) El crecimiento de las células tumorales y la carga tumoral en pulmón metastásico *in vivo* son significativamente suprimidos por la inactivación de Bptf. E-F) Supresión de la expresión de CCND2 y BCL-XL a nivel de ARNm y de
30 proteínas después de la inactivación de Bptf.

La figura 2A-G muestra los efectos de la supresión de la expresión de BPTF en el melanoma humano. A) Supresión de la expresión de BPTF a nivel del ARNm en células 1205-Lu. B) La supresión de BPTF induce la detención en G₀/G₁ y reduce la fase S del ciclo celular. C-D) Supresión significativa de la proliferación celular después de la inactivación de BPTF, según se determina mediante ensayos de la supervivencia celular y de formación de colonias, respectivamente. E) La inactivación de BPTF induce la apoptosis en células de melanoma. F-G) El crecimiento de las células tumorales y la carga tumoral en pulmón metastásico *in vivo* son significativamente suprimidos por la inactivación de BPTF.
35

La figura 3A-D muestra los efectos de la expresión de BPTF sobre la sensibilidad al tratamiento con ADNasa-I y sobre la vía de ERK1/2. A-B) La supresión de la expresión de BPTF potencia la hipersensibilidad a la ADNasa-I de las secuencias de promotor de BCL-XL y BCL-2 en células 1205-Lu y C8161.9. C-D) Expresión de CCND2, BCL-XL y BCL-2 a nivel del ARNm en dos líneas celulares de melanoma después de la supresión de BPTF en células 1205-Lu y C8161.9. C-F) Análisis de la transferencia Western que muestran la expresión de diversas proteínas después de la supresión de BPTF en células 1205-Lu y C8161.9.
40

La figura 4A-D muestra los niveles de BPTF en melanoma cutáneo primario. A-B) Análisis de Kaplan-Meier de DMFS y DSS en pacientes con melanoma con los niveles de expresión de BPTF más altos (curva 1) frente a todos los demás pacientes (curva 2). C-D) Fotomicrografías representativas de un análisis FISH que muestran un alto y bajo número de copias de BPTF en muestras de tejidos.
45

La figura 5A-H muestra los efectos de la modulación de la expresión de BPTF sobre la sensibilidad a inhibidores de BRAF selectivos. A-B) La inactivación BPTF sensibiliza a células de melanoma 1205-Lu frente a vemurafenib y dabrafenib. C-D) La sobreexpresión de BPTF en células de melanoma 1205-Lu confiere resistencia a inhibidores de BRAF. E) Tinción con H&E de especímenes de melanoma metastásico después de una resistencia adquirida al vemurafenib. F) Análisis inmunohistoquímico de la expresión de BPTF de la muestra en (E) que muestra un patrón heterogéneo de tinción de BPTF. G) Tinción de pan-melanoma del espécimen en (E). H) Análisis de la hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH) de copias de BPTF en el espécimen resistente.
50

La figura 6A-I muestra los efectos de la supresión de la expresión de BPTF en células de glioblastoma humano. A) Supresión de BPTF mediada por ARNh_c a nivel del ARNm en células U251. B-C) Supresión significativa de la proliferación celular después de la inactivación de BPTF, según se determina mediante ensayos de la supervivencia
55

5 celular y de formación de colonias, respectivamente. D) La supresión de BPTF induce la detención en G0/G1 y reduce la fase S del ciclo celular. E) La inactivación de BPTF induce la apoptosis en células U251. F) Expresión de ARNm de diferentes genes después de la supresión de BPTF. G) Análisis de la transferencia Western que muestra la expresión de diversas proteínas. H) Crecimiento *in vivo* de células U251 en ratones atímicos después de la supresión de BPTF. I) Expresión de BPTF en subtipos de GBM mesenquimáticos y pro-neurales.

La figura 7A-C demuestra que la supresión de BPTF suprime el potencial invasivo de células de melanoma murino B16-F10 (A), melanoma humano 1205-Lu (B), y U251 de GBM humano (C).

10 La figura 8A-F muestra los efectos de la supresión de BPTF en células de melanoma humano C8161.9. A) Supresión de la expresión de BPTF a nivel del ARNm en células de melanoma C8161.9. B-C) Supresión significativa de la proliferación celular después de la inactivación de BPTF, según se determina mediante ensayos de la supervivencia celular y de formación de colonias, respectivamente. D) La inactivación de BPTF induce la apoptosis en células de melanoma C8161.9. E) La inactivación de BPTF suprime la invasividad de células de melanoma C8161.9. F) El crecimiento tumoral *in vivo* de células C8161.9 es significativamente suprimido por la inactivación de BPTF.

15 La figura 9 demuestra que la sobreexpresión de BCL-XL o ERK rescata los efectos de la supresión de BPTF en la supervivencia de células de melanoma 1205-Lu.

Figura 10A-C: A) La sobreexpresión de BPTF potencia la proliferación celular en líneas de células de melanoma 1205-Lu. B) Niveles de expresión de diversos genes tras la sobreexpresión de BPTF. C) Análisis de la transferencia Western de diversas proteínas que muestran una sobreexpresión de BPTF.

20 La figura 11A-B muestra el análisis inmunohistoquímico de la expresión de BPTF en una micromatriz de tejidos, mostrando fotomicrografías ilustrativas de la expresión de BPTF. A) Melanoma primario que expresa niveles bajos de BPTF; B) Melanoma primario que expresa niveles altos de BPTF.

25 Figura 12A-B: A) La inactivación de BPTF sensibiliza a líneas de células de melanoma LOX frente al tratamiento con vemurafenib. B) La sobreexpresión de BPTF en líneas de células de melanoma LOX confiere resistencia al tratamiento con vemurafenib.

Figura 13A-D: A) Tinción con H&E (hematoxilina y eosina) de una muestra de tumor metastásico tras la resistencia a dabrafenib. B) Tinción inmunohistoquímica de una muestra de tumor que indica un patrón heterogéneo de tinción de BPTF. C) Tinción de pan-melanoma de un melanoma metastásico. D) Análisis de la hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH) del número de copias de BPTF en el melanoma metastásico.

30 Figura 14A-F: A) Supresión de ARNm de BPTF mediada por ARNhc en células de glioblastoma humano LN18. B-C) Supresión de la proliferación celular después de la inactivación de BPTF, según se determina mediante ensayos de la supervivencia celular y la formación de colonias, respectivamente. D) La inactivación de BPTF suprime la invasividad de células LN18. E-F) Nivel de expresión de diversos genes después de la supresión de BPTF. F) Análisis de la transferencia Western que muestra la expresión de diversas proteínas después de la supresión de BPTF.

La figura 15 demuestra que la supresión mediada por ARNhc de FALZ en líneas de células de cáncer de mama MDA-231 suprime la proliferación de células tumorales (panel izquierdo) y la invasividad (panel derecho).

La figura 16 demuestra que la supresión mediada por ARNhc de FALZ suprime la capacidad de formación de colonias (panel izquierdo) e induce la apoptosis (panel derecho) en líneas de células de cáncer de mama MDA-231.

40 La figura 17 muestra que la inactivación de FALZ en líneas de células de cáncer de mama MDA-231 suprime el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones atímicos (panel izquierdo). El panel derecho muestra un análisis de FISH de especímenes de tejido de cáncer de mama humano que indican un aumento en el número de copias de FALZ.

Descripción detallada

45 Tal como se emplean en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un polinucleótido" incluye una pluralidad de dichos polinucleótidos, y la referencia a "la célula" incluye la referencia a una o más células, etc.

50 A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta descripción. Aunque pueden emplearse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica de los métodos y composiciones descritos, en la presente se describen ejemplos de métodos, dispositivos y materiales.

Además, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. De modo similar, "comprende," "comprendiendo", "incluye" e "incluyendo" son intercambiables y no pretenden ser limitantes.

5 También debe entenderse que cuando las descripciones de diversas realizaciones emplean el término "comprende", los expertos en la técnica entenderán que, en algunos casos específicos, una realización puede describirse como alternativa empleando las expresiones "consiste fundamentalmente en" o "consiste en".

10 Todas las publicaciones analizadas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan solamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo que aparece en la presente debe considerarse un reconocimiento de que los inventores no tienen derecho a anteceder a dicha descripción en virtud de la descripción anterior. Además, con respecto a cualquier término o expresión que se presente en una o más publicaciones que sea similar o idéntico a un término o expresión que haya sido expresamente definido en esta descripción, la definición del término o expresión, tal como se proporciona expresamente en esta descripción, prevalecerá a todos los respectos.

15 La remodelación de los nucleosomas y la incorporación de variantes de histonas puede conseguirse en gran medida mediante la acción de complejos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP, que representan componentes cruciales de la maquinaria que controla la expresión de genes. Los factores de remodelación de la cromatina dependientes de ATP se clasifican en cuatro subfamilias principales (ISWI, SWI/SNF, CHD y INO80) basándose en la homología de secuencia de la ATPasa asociada.

20 Se reconoce que los factores de remodelación de la cromatina desempeñan un papel cada vez más importante en la tumorigénesis, puesto que se han demostrado recientemente mutaciones en reguladores de la cromatina en diversos cánceres humanos. Además, desde hace tiempo se piensa que el locus 17q24 contiene oncogenes, debido a su amplificación en una serie de tumores. El factor de transcripción de los dedos de PHD del bromodominio (BPTF; también denominado FALZ) (cuyo gen reside en 17q24), el componente más grande del complejo NURF, ha sido implicado en el desarrollo embrionario, la maduración de timocitos y la remodelación de la cromatina. El complejo NURF en mamíferos es un complejo de remodelación de la cromatina dependiente de ATP bien caracterizado. Sin embargo, poco se sabe del papel funcional desempeñado por BPTF en la tumorigénesis.

25 El factor de remodelación de nucleosomas (NURF), identificado en *Drosophila melanogaster*, es un miembro clave de la familia ISWI de factores de remodelación de la cromatina dependientes de ATP. En mamíferos, el BPTF (factor de transcripción de los dedos de PHD del bromodominio) representa el ortólogo NURF301 de *Drosophila*, la subunidad más grande del complejo de remodelación de cromatina NURF. El homólogo NURF301 existe en todas las especies eucariotas y parece estar evolutivamente conservado. NURF301 participa en la regulación de la expresión de Engrailed 1 y 2, probablemente cambiando el alineamiento periódico de los nucleosomas.

30 El complejo NURF media en algunas de las funciones celulares a través de una interacción con factores de transcripción específicos de secuencia. En *Drosophila*, se ha demostrado que el factor de choque térmico ("heat shock factor", HSF), GAGA, y el dominio artificial VP16 interaccionan con múltiples superficies en NURF301 y débilmente con ISWI. NURF301 posee dos dominios bien caracterizados que se unen a modificaciones postraduccionales de histonas específicas. El dedo PHD yuxtapuesto al bromodominio interacciona con H3K4me2/3 y el bromodominio adyacente se une a H4K16ac. Además, es probable que NURF interaccione directamente con el ADN de una manera específica de secuencia. Se ha indicado que BPTF (también denominado FALZ) es fundamental en el desarrollo embrionario y está implicado en la remodelación de la cromatina dependiente de ATP.

35 La descripción demuestra que BPTF (a veces denominado FALZ en la presente) está significativamente sobreexpresado en melanomas metastásicos y cáncer de mama mediante análisis de micromatrices de ADNc y FISH. El BPTF humano (SEQ ID NO:1) está localizado en el cromosoma 17q24, que es un punto caliente para los cambios cromosómicos en muchos tumores. Se ha demostrado la amplificación de 17q24 en el cáncer de mama y se ha observado un mayor número de copias de 17q24 en otros tumores sólidos. Se demostró una translocación que se produce en el locus 17q24.3, que incluye el gen BPTF, en células embrionarias de pulmón. FAC1 (clon 1 reactivo a Alz-50 fetal), una forma truncada de BPTF, se encuentra sobrerregulado en enfermedades neurodegenerativas, muestra una actividad de unión al ADN específica de secuencia, y puede actuar en la regulación transcripcional. Aunque la importancia de los complejos de remodelación, tales como NURF, se entiende bien, el papel funcional de BPTF en la tumorigénesis no se ha caracterizado por completo hasta la fecha.

40 Esta descripción describe un papel funcional y biológico del BPTF en el melanoma, el glioblastoma multiforme (GBM), y el cáncer de mama. Aunque se analizan específicamente estos tipos de cánceres, se contempla el papel de BPTF en otros tumores y cánceres. La descripción demuestra que la supresión dirigida de BPTF suprime la proliferación de células de melanoma, de GBM y de cáncer de mama, que el número de copias de BPTF es elevado en una proporción significativa de melanomas y de cánceres de mama, y que la sobreexpresión de BPTF es un marcador de la menor supervivencia en pacientes con melanoma humanos. Además, el BPTF modula la vía de ERK y confiere resistencia adquirida a inhibidores de BRAF selectivos en células de melanoma con BRAF mutante.

45 La descripción demuestra la importancia funcional y biológica de BPTF en el avance de tumores, con un enfoque especial en el melanoma, el glioblastoma y el cáncer de mama. La supresión de la expresión de BPTF en las células

de melanoma murino y las células de cáncer de mama produce una supresión significativa de la proliferación de células tumorales y de la invasividad. Los estudios *in vivo* han confirmado el poderoso papel desempeñado por el BPTF en el avance del melanoma, puesto que se observó una disminución significativa en el crecimiento de las células tumorales y el recuento tumoral metastásico empleando diferentes ARNhc que se dirigen a BPTF. Los efectos del BPTF sobre el avance del ciclo celular y sobre el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo* fueron confirmados en dos líneas celulares de melanoma humano y de GBM, así como en células de cáncer de mama.

Para obtener información acerca de los mecanismos de la función del BPTF en las células de melanoma, análisis integrados identificaron la infrarregulación de BCL2, BCL-XL y CCND2, que son mediadores clave de la proliferación de células tumorales, el avance del ciclo celular y la apoptosis, después de la supresión de la expresión de BPTF. La infrarregulación de estos genes fue confirmada por qRT-PCR y análisis de la transferencia Western en líneas celulares de melanoma y GBM. Puesto que se ha demostrado que el complejo NURF en mamíferos influye en la colocación de los nucleosomas y los sitios de hipersensibilidad a nucleasas *in vitro*, la descripción demuestra que la supresión de la expresión de BPTF potencia la sensibilidad al tratamiento con ADNasa I de los genes BCL2 y BCL-XL.

Más allá del análisis del mecanismo de la acción del BPTF en el melanoma, el cáncer de mama y el GBM, también se realizó un análisis detallado del papel de BPTF como biomarcador del melanoma. Un análisis FISH del melanoma primario reveló un elevado número de copias de BPTF en 36% de los casos, por contraste con los nevi benignos, en los que el aumento en el número de copias de BPTF estaba ausente. Esto sugiere la utilidad potencial de BPTF como marcador de diagnóstico potencial para distinguir el melanoma de los nevi. Además, el aumento en el número de copias de BPTF observado puede proporcionar un mecanismo para la activación de BPTF en el melanoma, identificando una base genética para la sobreexpresión de BPTF observada en el análisis del perfil de expresión del gen. Además, un análisis de formación de imágenes digitales de inmunotinción de BPTF identificó la sobreexpresión de BPTF como una variable predictiva independiente de la supervivencia específica de enfermedad y sin metástasis distantes en pacientes con melanoma humanos. Así, estos estudios demuestran que BPTF es una variable predictiva y un promotor de la metástasis distante, el acontecimiento mortal en el avance del melanoma. Tomados conjuntamente, estos descubrimientos consolidan al BPTF como una nueva diana, marcador molecular y mediador de la tumorigénesis del melanoma y el avance del tumor. Además, el análisis de la expresión de BPTF en tejidos de GBM y células de cáncer de mama indica que la expresión de BPTF es mayor en el subtipo pro-neural de GBM, que responde mal a agentes quimioterapéuticos, y en células de cáncer de mama.

BRAF es un importante impulsor oncogénico en el melanoma en virtud de mutaciones puntuales en 40-50% de los casos. El BRAF mutante activa constitutivamente la vía de la MAP quinasa y transduce señales pro-proliferativas y pro-supervivencia en células de melanoma, además de estimular la invasión de células tumorales y la angiogénesis. De manera importante, la supresión de la expresión de BPTF produce unos pronunciados efectos antitumorales en células de melanoma que portan BRAF mutante (C8161.9) o de tipo salvaje (C8161.9), y producen unos niveles significativamente reducidos de ERK1/2 fosforilado (Thr204/Tyr204), así como su diana directa p90RSK (Ser380), que representa a efectores corriente abajo de la vía de MAPK. Curiosamente, tres de los genes que fueron suprimidos tras la inactivación de BPTF (BCL2, BCL-XL y CCND2) son regulados por ERK. Esos descubrimientos proporcionan pruebas de que BPTF activa la vía de MAPK y, por tanto, potencia la proliferación de células tumorales, la invasividad y la supervivencia, al mismo tiempo que suprime la apoptosis de células tumorales.

Se ha demostrado que el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico que portan una mutación de BRAF con inhibidores de BRAF selectivos confiere una ventaja de supervivencia global. Sin embargo, las respuestas completas son poco habituales y se desarrolla una resistencia adquirida a estos agentes en la mayoría de los casos tratados. Se han descrito varios mecanismos de resistencia adquirida, que principalmente incluyen la reactivación de la vía de MAPK [por medio de mutaciones de N-RAS o sobreexpresión de COT/MAP3K8 quinasa], la activación del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas o a través de la activación de la vía de PI3K (por medio de la sobreexpresión de IGF1R). La descripción demuestra que la modulación de la expresión de BPTF (por sobreexpresión o infrarregulación mediada por ARNhc) modula significativamente la sensibilidad de las células de melanoma con BRAF mutante frente a inhibidores de BRAF selectivos y proporciona además nuevas pruebas de que están implicados factores de remodelación de la cromatina en la estimulación de la resistencia adquirida a terapias dirigidas en el cáncer. Además del análisis del mecanismo de la sensibilidad a los inhibidores de BRAF en líneas de células de melanoma, el análisis de especímenes antes y después del avance con inhibidores de BRAF selectivos indica un aumento en el número de copias de BPTF tras aparecer una resistencia terapéutica en un subconjunto de casos. Esto sugiere que la activación de BPTF puede seleccionarse para una resistencia duradera a la terapia dirigida en el melanoma, puesto que puede estimular la proliferación y la supervivencia de las células de melanoma.

De modo sorprendente, se observa una diferencia significativa en el análisis inmunohistoquímico de la expresión de BPTF en las lesiones de pretratamiento y de avance. Aunque la expresión de BPTF en el tumor metastásico antes del tratamiento es homogénea, el análisis de las lesiones en avance identificó, en algunos tumores, clones de células diferenciados con una morfología y expresión de BPTF divergente. Un clon de células tumorales (sin tinción de BPTF) representa a las células apoptóticas que parecen haber respondido a la terapia, mientras que el otro clon identifica a las células supervivientes (con una fuerte tinción de BPTF) que probablemente representan al clon

resistente. Esto conduce a la enigmática especulación de que el tumor metastásico resistente a la terapia dirigida no es homogéneamente resistente, sino que está compuesto de subpoblaciones de células que siguen respondiendo activamente al tratamiento. Estas observaciones son coherentes con la reciente demostración de la heterogeneidad molecular intratumoral del carcinoma de células renales y están apoyadas por un reciente estudio que demostró la expresión de marcadores inmunohistoquímicos heterogéneos en el melanoma metastásico tras el avance en la terapia dirigida. Tomados conjuntamente, estos resultados claramente apoyan el intento de estudiar la utilidad potencial de las terapias de combinación que se están planeando o que se están llevando a cabo, que se dirigen a algunos de los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente. Además, sugieren que el establecimiento de BPTF como diana es una estrategia posible para solucionar la resistencia a inhibidores de BRAF, o como un posible tratamiento de combinación para los melanomas metastásicos con BRAF mutante.

En un reciente estudio, BPTF se encontraba entre un grupo de factores de remodelación de la cromatina mutados en cánceres de hígado mediante secuenciación del genoma completo. El análisis de la base de datos COSMIC revela mutaciones en BPTF en un pequeño número de cánceres de piel, que incluyen el melanoma. La descripción demuestra el papel oncogénico del BPTF en el melanoma, el cáncer de mama y el glioblastoma, dirigido en parte por un aumento en el número de copias en un subconjunto de casos. Los resultados presentados en la presente asignan un nuevo papel funcional al BPTF en el avance del tumor en virtud de sus efectos sobre la proliferación y la supervivencia de células, por medio de la activación de BCL2, BCL-XL, CCND2, y ERK. La sobreexpresión de BPTF es una variable predictiva independiente de la supervivencia asociada al melanoma. Además, unos niveles mayores de BPTF estimulan la resistencia a terapias dirigidas a BRAF mutante, y pueden seleccionarse para la resistencia adquirida duradera a estos agentes.

A la vista de los datos proporcionados en la presente y en los siguientes ejemplos, la descripción proporciona métodos y composiciones útiles para (a) tratar cánceres que presentan una expresión aberrante de BPTF, (b) aumentar la terapia dirigida empleando productos quimioterapéuticos de primera línea existentes y anticuerpos mediante la inhibición de la resistencia a fármacos inducida que surge de la expresión de BPTF, y (c) realizar un diagnóstico útil para identificar el avance y la terapia del cáncer. Los agentes para su uso en los tratamientos descritos en la presente pueden emplear la terapia de ácidos nucleicos inhibidores (por ejemplo, ARN_hc, ARN_ic, moléculas antisentido y similares) para infrarregular la expresión de BPTF. Como alternativa, la descripción puede mejorar una terapia combinando un inhibidor de BPTF (por ejemplo, un inhibidor de bromodominio) con productos terapéuticos de primera línea. Se describen ejemplos de inhibidores de bromodominios, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2014/0066410. En esta última realización, los agentes y las composiciones serían una combinación de un inhibidor de bromodominio y un producto terapéutico de primera línea contra el cáncer. El inhibidor de bromodominio puede administrarse antes, en combinación o después de la administración del producto terapéutico/quimioterapéutico de primera línea.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "oligonucleótido antisentido" se refiere a un ácido nucleico modificado o no modificado que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia polinucleotídica de BPTF que incluye secuencias polinucleotídicas asociadas con la transcripción o la traducción de BPTF (por ejemplo, un promotor de un polinucleótido de BPTF), en el que el polinucleótido antisentido es capaz de hibridarse con una secuencia polinucleotídica de BPTF. De particular interés son los polinucleótidos antisentido capaces de inhibir la transcripción y/o la traducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido de BPTF *in vitro* o *in vivo*. Dichos oligonucleótidos antisentido pueden transportarse a una célula diana por medio de terapia génica (por ejemplo, vectores víricos recombinantes), unirse operablemente a restos neutralizantes con carga (por ejemplo, TAT u otros dominios de transducción de señales; véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes de EE. UU. n.os 2009/0093425, 2009/0093026, y 2006/0222657) o técnicas de transporte directo de ácidos nucleicos.

Tal como se emplea en la presente, las expresiones "oligonucleótidos de ARN_ic", "oligonucleótidos de ARN_i", "ARN de interferencia corto" o el término "ARN_ic" se emplean de modo intercambiable y se refieren a oligonucleótidos que actúan a través del silenciamiento de genes postranscripcional, también conocidos como ARN de interferencia (ARN_i). Las expresiones y el término se refieren a una molécula de ácido nucleico bicatenaria capaz de interferir en el ARN, "ARN_i" (véase Kreuzer *et al.*, documento WO 00/44895; Zernicka-Goetz *et al.* documento WO 01/36646; Fire, documento WO 99/32619; Mello y Fire, documento WO 01/29058). Las moléculas de ARN_ic, en general, son moléculas de ARN, pero incluyen además no nucleótidos y nucleótidos químicamente modificados. Se han realizado experimentos de transporte dirigido a genes de ARN_ic mediante transferencia transitoria de ARN_ic a células (que se logra por métodos clásicos, tales como transfección mediada por liposomas, electroporación o microinyección). Las moléculas de ARN_ic son ARN de 21 a 23 nucleótidos, con extremos colgantes 3' de 2 a 3 nucleótidos característicos que se parecen a los productos del procesamiento de la ARNasa III de ARN bicatenarios largos (ARN_{bc}) que normalmente inician el ARN_i.

El aprovechamiento eficaz de la vía del ARN_ic para mediar en el silenciamiento de genes depende, en parte, de los métodos eficaces de transporte intracelular de ARN_ic. Las moléculas de ARN_ic tienen a tener una vida corta en la célula, no se transportan con facilidad a tipos celulares que son difíciles de transfectar y son relativamente caros de producir mediante síntesis química (Jacks *et al.* (2005), *Biotechniques*, 39:215- 224; Bernards *et al.* (2006), *Nature Methods*, 3:701-706).

Un método para el transporte intracelular eficaz de ARN_i es el uso de ARN de horquilla corta o "ARN_{hc}". Los ARN_{hc} son moléculas de ARN monocatenario que incluyen dos secuencias complementarias unidas por una región no complementaria. *In vivo*, las secuencias complementarias se asocian para crear una hélice bicatenaria con un bucle desapareado en un extremo. La estructura con forma de piruleta resultante se denomina un tallo-bucle y puede ser reconocida por la maquinaria del ARN_i y ser procesada de modo intracelular para formar dúplex de ARN cortos que tienen propiedades similares al ARN_i.

El ARN_{hc} puede sintetizarse en una célula mediante transcripción a partir de un molde de ADN que se ha insertado en un vector apropiado. Los ARN_{hc} útiles generalmente tienen una longitud de 50-70 nucleótidos, con dos secuencias complementarias de 19-29 separadas por un bucle de 5-10 nucleótidos. La construcción del ARN_{hc} en general se lleva a cabo mediante uno de varios métodos: asociación de oligonucleótidos complementarios; reacción en cadena con polimerasa basada en promotores (PCR); o extensión con cebadores. Muchos sistemas de vectores emplean promotores de ARN Pol III; la transcripción mediada por Pol III resulta ventajosa porque se inicia en un sitio de inicio bien definido, produce un transcrito que no contiene poli (A), y los promotores de Pol III están activos en todos los tipos celulares (Brummelkamp *et al.* (2002), *Science*, 296:550-553; McIntyre, G. y Fanning, G. (2006), *BMC Biotechnology*, 6:1-8).

Los sistemas de vectores que codifican ARN_{hc} proporcionan una fuente intracelular renovable de reactivos de silenciamiento de genes que pueden mediar en el silenciamiento de genes persistente después de la integración estable del vector en el genoma del hospedante. Además, el módulo de ARN_{hc} puede insertarse con facilidad en vectores retrovíricos, lentivíricos o adenovíricos para facilitar el transporte del ARN_{hc} a una amplia gama de tipos de células, que incluyen cultivos primarios que no se dividen. Las versiones regulables de vectores de ARN_{hc} son particularmente útiles para selecciones genéticas.

Como alternativa, las moléculas de ARN_i pueden transportarse por medio de composiciones y procesos de neutralización de carga (por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 2009/0093425, 2009/0093026, y el documento WO/2014/031575).

En una realización, la descripción proporciona agentes y composiciones para su uso en el tratamiento del melanoma, en los que las células cancerosas del melanoma comprenden la sobreexpresión de un BPTF, y los agentes comprenden una composición que comprende un inhibidor de ácido nucleico de BPTF. Estos inhibidores de ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo, ARN_i, ARN_{hc} y sus precursores. Por ejemplo, la descripción demuestra que puede emplearse ARN_{hc} para su uso para inactivar la expresión de BPTF y proporcionar resultados beneficiosos. Dichos ARN_{hc} incluyen, pero no se limitan a ARN_{hc} 1 de BPTF: TGGCTGTGATCGGTGTCAGAATTGGTACC (SEQ ID NO:3; en la que T puede ser U); ARN_{hc} 2 de BPTF: GGTGATGAAGCATAATGCTGTA ATAGAAC (SEQ ID NO:4; en la que T puede ser U); y ARN_{hc} 3 de BPTF (SEQ ID NO:5; en la que T puede ser U): ATTTAGATTCATCATAAGGCG, así como cualquiera de las anteriores que comprenda una base modificada, un resto de neutralización de carga y similares. Los ácidos nucleicos inhibidores se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un medicamento que produce un efecto medicinal, observado como una reducción o una reversión de uno o más criterios de valoración clínicos, crecimiento y/o supervivencia de células cancerosas, metástasis de células cancerosas en un individuo, o reducción de la resistencia de una célula cancerosa frente a un producto quimioterapéutico de un agente anticáncer de primera línea, cuando una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento se administra al individuo. Las cantidades terapéuticamente eficaces se determinan generalmente mediante el efecto que producen, comparado con el efecto observado cuando una composición que no incluye un ingrediente activo se administra a un individuo en situación similar. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del tamaño y salud del sujeto, de la naturaleza y el grado del trastorno, y del producto terapéutico o combinación de productos terapéuticos seleccionados para la administración. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación concreta será determinada por medio de la experimentación habitual y según el criterio del médico.

Tal como se emplean en la presente, las expresiones "en combinación con" o "junto con" se refieren a la administración de los moduladores de BPTF de la descripción con otros regímenes terapéuticos.

Tal como se emplea en la presente, el término "susceptible" se refiere a pacientes para los cuales la terapia con BPTF es un método aceptable de tratamiento, por ejemplo, pacientes que es probable que respondan positivamente. Los pacientes con cáncer susceptibles a una terapia con BPTF expresan niveles altos de BPTF con relación a los pacientes que no son susceptibles a la terapia con BPTF. Los pacientes con cáncer que no son buenos candidatos a una terapia con BPTF incluyen pacientes con cáncer con muestras tumorales que carecen o tienen niveles bajos de BPTF en el interior o sobre las células cancerosas.

Tal como se emplea en la presente, el término "detectar" significa establecer, descubrir o determinar que existen pruebas de una actividad (por ejemplo, expresión génica) o una biomolécula (por ejemplo, un polipéptido).

Tal como se emplea en la presente, las expresiones "secuencia de nucleótidos homóloga" o "secuencia de aminoácidos homóloga" o sus variaciones, se refieren a secuencias que se caracterizan por una homología, a nivel

de nucleótidos o a nivel de aminoácidos, de al menos un porcentaje especificado, y se emplean de modo intercambiable con "identidad de secuencia". Las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen las secuencias que codifican isoformas de proteínas. Estas isoformas pueden expresarse en diferentes tejidos del mismo organismo como resultado, por ejemplo, de un corte y empalme alternativo del ARN. Como alternativa, las isoformas pueden ser codificadas por genes diferentes. Las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de una especie distinta del ser humano que incluye, pero no se limita a mamíferos. Las secuencias de nucleótidos homólogas también incluyen, pero no se limitan a variaciones alélicas naturales y mutaciones de las secuencias de nucleótidos indicadas en la presente. Las secuencias de aminoácidos homólogas incluyen las secuencias de aminoácidos que contienen sustituciones conservativas de aminoácidos y cuyos polipéptidos tienen la misma actividad y/o unión.

El porcentaje de homología o identidad puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), empleando los ajustes por defecto, que emplea el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489). En algunas realizaciones, la homología entre la sonda y la diana es de entre aproximadamente 50% a aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos contienen nucleótidos que son aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 92%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y aproximadamente 100% homólogos con SEQ ID NO:1, o una de sus porciones. La descripción proporciona además complementos parciales o completos de SEQ ID NO:1 o sus homólogos.

La homología también puede aparecer a nivel de polipéptido. En algunas realizaciones, los polipéptidos son aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 92%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y aproximadamente 100% homólogos con SEQ ID NO:2, o una de sus porciones.

Tal como se emplea en la presente, el término "sonda" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos de longitud variable. En algunas realizaciones, las sondas comprenden al menos aproximadamente 10 y tantos como aproximadamente 6.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas comprenden al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 20, al menos 25, al menos 50 o al menos 75 nucleótidos consecutivos. Las sondas se emplean para la detección de secuencias de ácidos nucleicos idénticas, similares o complementarias. Las sondas de longitud mayor habitualmente se obtienen de fuentes naturales o recombinantes, son muy específicas para la secuencia diana y se hibridan con mucha mayor lentitud a la diana que los oligómeros. Las sondas pueden ser monocatenarias o bicatenarias y se diseñan para que tengan especificidad en las tecnologías similares a PCR, basadas en membranas de hibridación, hibridación *in situ* (ISH), hibridación fluorescente *in situ* (FISH), o ELISA.

Tal como se emplea en la presente, el término "mezclar" se refiere al proceso de combinar uno o más compuestos, células, moléculas y similares en el mismo área. Esto puede realizarse, por ejemplo, en un tubo de ensayo, placa Petri o cualquier recipiente que permita mezclar uno o más compuestos, células o moléculas.

Tal como se emplea en la presente, el término "aislado" se refiere a un polinucleótido, un polipéptido, un anticuerpo o una célula hospedante que se encuentra en un entorno diferente del que se encuentra el polinucleótido, el polipéptido o el anticuerpo en la naturaleza. Los métodos para aislar células son muy conocidos por los expertos en la técnica. Un polinucleótido, un polipéptido o un anticuerpo que está aislado en general está sustancialmente purificado.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "sustancialmente purificado" se refiere a un compuesto (por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido o un anticuerpo) que se retira de su entorno natural y está al menos 60% exento, al menos 75% exento, y al menos 90% exento de otros componentes con los que está asociado en la naturaleza.

Tal como se emplea en la presente, el término "unión" significa la interacción física o química entre dos o más biomoléculas o compuestos. La unión incluye interacciones iónicas, no iónicas, de enlaces de hidrógeno, de Van der Waals, hidrófobas, etc. La unión puede ser directa o indirecta; indirecta es a través o debida a los efectos de otra biomolécula o compuesto. La unión directa se refiere a interacciones que no se producen a través o debidas al efecto de otra molécula o compuesto, sino que se producen sin intermedios químicos sustanciales.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "poner en contacto" significa aproximar, de modo directo o indirecto, una molécula para que se encuentre en proximidad física con una segunda molécula. La molécula puede ser cualquiera de una serie de tampones, sales, disoluciones, etc. "Poner en contacto" incluye, por ejemplo, colocar un polinucleótido en un vaso de precipitado, placa de microtitulación, matraz de cultivo celular o micromatriz o similares, que contiene una molécula de ácido nucleico. Poner en contacto también incluye, por ejemplo, colocar un anticuerpo en un vaso de precipitado, placa de microtitulación, matraz de cultivo celular o micromatriz o similares, que contiene un polipéptido. El contacto puede realizarse *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda, un cebador o un oligonucleótido se hibrida con su secuencia diana, aunque también con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridarán con especificidad con sus complementos apropiados a temperaturas mayores. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) en la cual 50% de las sondas complementarias con la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio. Puesto que las secuencias diana en general están presentes en exceso, a la T_m , 50% de las sondas están hibridadas con sus complementos en el equilibrio. Generalmente, las condiciones rigurosas son las condiciones en las cuales la concentración salina es menor que aproximadamente 1,0 M de ion sodio, generalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos de aproximadamente 30 °C para sondas, cebadores u oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para sondas, cebadores u oligonucleótidos más largos. Las condiciones rigurosas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "condiciones de hibridación moderadas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda, un cebador o un oligonucleótido se hibrida con su secuencia diana, aunque también con un número limitado de otras secuencias. Las condiciones moderadas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las condiciones moderadas son muy conocidas por los expertos en la técnica y se describen, entre otros textos, en Maniatis *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 2ª edición (diciembre de 1989)).

Las composiciones de ácidos nucleicos descritas en la presente pueden emplearse, por ejemplo, para producir polipéptidos, como sondas para la detección de ARNm en muestras biológicas (por ejemplo, extractos de células humanas) o ADN producido a partir de dichas muestras, para generar copias adicionales de los polinucleótidos, para generar ribozimas u oligonucleótidos (monocatenarios y bicatenarios) y como sondas de ADN monocatenario o como oligonucleótidos que forman hélices triples. Las sondas descritas en la presente pueden emplearse, por ejemplo, para determinar la presencia o la ausencia de los polinucleótidos proporcionados en la presente en una muestra. Los polipéptidos pueden emplearse para generar anticuerpos específicos para un polipéptido asociado al cáncer, y dichos anticuerpos, a su vez, son útiles en métodos de diagnóstico, métodos de pronóstico y similares, tal como se analiza con más detalle en la presente. Los polipéptidos también son útiles como dianas para la intervención terapéutica, tal como se analiza con más detalle en la presente. Los anticuerpos de la descripción también pueden usarse, por ejemplo, para purificar, detectar y transportar los polipéptidos de la presente, incluyendo métodos de diagnóstico y terapéuticos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos son útiles en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente los niveles de los polipéptidos de la presente invención en muestras biológicas. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed., 1988). Estos y otros usos se describen con más detalle a continuación. Se conocen anticuerpos contra BPTF (por ejemplo, de Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, EE. UU.).

Tal como se emplea en la presente, la expresión "agente formador de imágenes" se refiere a una composición unida a un anticuerpo, molécula pequeña o sonda de la descripción que puede detectarse empleando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Tal como se emplea en la presente, la expresión "pruebas de expresión génica" se refiere a cualquier indicio mensurable que indique que un gen se ha expresado.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. La expresión se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induce en sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y que puede administrarse sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos y partículas de virus inactivos. Estos vehículos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden incluir líquidos, tales como agua, disolución salina, glicerol y etanol. También pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulgentes, sustancias tamponantes del pH y similares, en dichos vehículos.

Los ejemplos específicos de cánceres que pueden ser tratados mediante los agentes y composiciones de la descripción incluyen, pero no se limitan a cánceres asociados a BPTF. Tal como se emplea en la presente, un "cáncer asociado a BPTF" se refiere a un cáncer que se caracteriza por células que expresan diferencialmente BPTF, con relación a células no cancerosas. La descripción también es aplicable a cualquier tipo de célula tumoral en la que el BPTF desempeña un papel en el crecimiento de células cancerosas, la formación de tumores, la proliferación de células cancerosas, la metástasis de células cancerosas, la migración de células, la resistencia a productos terapéuticos y la angiogénesis.

La descripción proporciona agentes y composiciones que proporcionan el tratamiento, la inhibición y la gestión de enfermedades y trastornos asociados con la sobreexpresión de BPTF, así como el tratamiento, la inhibición y la gestión de los síntomas de dichas enfermedades y trastornos. Algunas realizaciones de la invención se refieren a

agentes y composiciones que comprenden composiciones que tratan, inhiben o gestionan el cáncer de melanoma que incluyen, sin limitación, la metástasis del cáncer, la proliferación de células cancerosas, el crecimiento de células cancerosas y la invasión de células cancerosas.

5 La descripción proporciona además agentes y composiciones que incluyen otros ingredientes activos en combinación con los inhibidores y moduladores de BPTF de la descripción. En algunas realizaciones, los agentes y composiciones para su uso según la descripción se proporcionan además para la administración con uno o más productos terapéuticos para el cáncer convencionales al paciente. En algunas realizaciones, los usos comprenden además tratar al paciente con uno o más de quimioterapia, terapia de radiación o cirugía en combinación con un inhibidor o modulador de BPTF. La administración de BPTF en combinación con cualquier otra terapia puede realizarse antes, de modo simultáneo o después de la administración de la terapia sin BPTF.

10 La descripción también proporciona métodos de diagnóstico y/o de formación de imágenes empleando los moduladores de BPTF de la descripción, en particular, anticuerpos inhibidores de BPTF y moléculas de ARN inhibidor pequeñas (por ejemplo, ARN_i, ARN_h y similares) para diagnosticar el cáncer y/o predecir el avance del cáncer. En algunas realizaciones, los métodos de la descripción proporcionan métodos para la formación de imágenes y la localización de tumores y/o metástasis y métodos de diagnóstico y pronóstico de un cáncer. En algunas realizaciones, los métodos de la descripción proporcionan métodos para evaluar la idoneidad de una terapia relacionada con BPTF.

15 La descripción proporciona moduladores e inhibidores de BPTF para, entre otras cuestiones, el tratamiento, el diagnóstico, la detección o la formación de imágenes de un cáncer. Los inhibidores o moduladores de BPTF también son útiles para la preparación de medicamentos para el tratamiento del cáncer.

20 En algunas realizaciones, el modulador o inhibidor de BPTF es un oligonucleótido, una molécula pequeña, un mimético o un anticuerpo. En algunas realizaciones, el modulador de BPTF inhibe una actividad biológica de BPTF en 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100%, comparado con un control. En algunas realizaciones, el modulador de BPTF inhibe la expresión de BPTF en al menos 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100%, comparado con un control.

25 Tal como se emplea en la presente, un modulador de BPTF incluye cualquier agente que modula la expresión o la actividad de BPTF. Un "modulador" puede ser antagonista o agonista. Para el tratamiento de cánceres, el modulador de BPTF es una molécula inhibidora o antagonista. Los ejemplos de agentes inhibidores de BPTF incluyen anticuerpos inhibidores, inhibidores de molécula pequeña (por ejemplo, inhibidores del bromodominio), y moléculas de ácidos nucleicos de inhibidores. Los anticuerpos inhibidores de BPTF incluyen anticuerpos que inhiben o reducen la actividad biológica de un polipéptido de BPTF (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO:2, o uno de sus mutantes o variantes).

30 En algunas realizaciones, el modulador de BPTF es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario o un fragmento Fab. El anticuerpo puede estar marcado, por ejemplo, con una enzima, un radioisótopo, o un fluoróforo. En algunas realizaciones, el modulador de BPTF es un anticuerpo monoclonal que se une a BPTF que consiste en una secuencia indicada en SEQ ID NO:2. En aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo puede estar marcado con un marcador detectable.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante una diversidad de métodos que incluyen, por ejemplo: (1) injertando las regiones determinantes de la complementariedad ("complementary determining regions", CDR) en un marco y región constante humanos (un proceso denominado en la técnica "humanizar"), o, como alternativa, (2) trasplantar los dominios variables no humanos enteros, y "ocultarlos" con una superficie similar a una superficie humana mediante la sustitución de restos de la superficie (un proceso denominado en la técnica "acondicionamiento"). En la invención, los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos "humanizados" y "acondicionados". De modo similar, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones, en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Tras la exposición se observa una producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en seres humanos en todos los aspectos, que incluyen la redistribución de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature, 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368, 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology, 14, 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13, 65-93 (1995); Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoever *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol., 31(3):169-217 (1994); y Kettleborough, C. A. *et al.*, Protein Eng., 4(7):773-783 (1991).

Un anticuerpo contra BPTF puede utilizarse solo o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos también pueden condensarse de modo recombinante con un polipéptido heterólogo en el N- o C- terminal o

conjugarse de modo químico (que incluye conjugaciones covalentes o no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la descripción pueden condensarse de modo recombinante o conjugarse a moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras, tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de EE. UU. n.º 5.314.995; y el documento EP 396.387.

Además de los anticuerpos quiméricos y humanizados, pueden obtenerse anticuerpos totalmente humanos a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.075.181, 6.091.001, y 6.114.598), o a partir de bancos de presentación de fagos de genes de inmunoglobulinas humanas (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990); Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991); y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)).

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse empleando el método de Kohler *et al.* (1975), Nature, 256:495-496, o una modificación de este. Generalmente, un ratón se inmuniza con una disolución que contiene un antígeno. La inmunización puede realizarse mezclando o emulsionando la disolución que contiene el antígeno en disolución salina, preferiblemente en un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o la emulsión por vía parenteral. Puede emplearse cualquier método de inmunización conocido en la técnica para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención. Después de la inmunización del animal, se retira el bazo (y, opcionalmente, varios nódulos linfáticos grandes) y se disocian en células individuales. Las células del bazo pueden seleccionarse aplicando una suspensión de células a una placa o pocillo revestido con el antígeno de interés. Las células B que expresan la inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no son lavadas. Las células B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, después se inducen para que se fusionen con células de mieloma para formar hibridomas y se cultivan en un medio selectivo. Las células resultantes se cultivan en placa mediante dilución en serie o limitante y se ensayan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés (y que no se une a antígenos no relacionados). Los hibridomas que segregan el anticuerpo monoclonal (mAb) seleccionados después se cultivan *in vitro* (por ejemplo, en botellas de cultivo de tejidos o reactores de fibras huecas) o *in vivo* (como fluido de ascitis en ratones).

Como alternativa al uso de hibridomas para la expresión, los anticuerpos pueden producirse en una línea celular, tal como una línea de células CHO o de mieloma, tal como se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.545.403; 5.545.405; y 5.998.144. Brevemente, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Mediante la transfección de las dos proteínas en vectores distintos se pueden producir anticuerpos quiméricos (Immunol., 147:8; Banchereau *et al.* (1991), Clin. Immunol. Spectrum, 3:8; y Banchereau *et al.* (1991), Science, 251:70).

La expresión "región determinante de la complementariedad" se refiere a secuencias de aminoácidos que, juntas, definen la afinidad de unión y la especificidad de la región FY natural de un sitio de unión a inmunoglobulina nativo. Véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Rabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services Nat Publication No. 91-3242 (1991). La expresión "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. En la presente invención, las regiones constantes de ratón son sustituidas por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados de la presente se derivan de inmunoglobulinas humanas. La región constante de cadena pesada puede seleccionarse de cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Un método para humanizar anticuerpos comprende alinear las secuencias de cadena ligera y pesada no humanas con la secuencias de cadena ligera y pesada humanas, seleccionar y sustituir el marco no humano por un marco humano basándose en dicho alineamiento, formar modelos moleculares para predecir la conformación de la secuencia humanizada, y comparar con la conformación del anticuerpo de origen. A este proceso le sigue una retromutación de restos en la región CDR que alteran la estructura de las CDR hasta que la conformación predicha del modelo de secuencia humanizada se parezca mucho a la conformación de las CDR no humanas del anticuerpo no humano de origen. Estos anticuerpos humanizados pueden modificarse aún más para facilitar la captación y la eliminación, por ejemplo, por medio de receptores de Ashwell. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.530.101 y 5.585.089.

Los anticuerpos humanizados también pueden producirse empleando animales transgénicos que se modifican para que contengan loci de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, el documento WO 98/24893 describe animales transgénicos que poseen un locus de Ig humana, en los que los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de los loci de cadena ligera y pesada endógenos. El documento WO 91/10741 también describe hospedantes mamíferos no primates transgénicos capaces de producir una respuesta inmunológica frente a un inmunógeno, en los que los anticuerpos presentan regiones constantes y/o variables de primates, y en los que los loci que codifican inmunoglobulinas endógenas están sustituidos o inactivados. El documento WO 96/30498 describe el uso del sistema Cre/Lox para modificar el locus de inmunoglobulina en un mamífero para reemplazar toda o una porción de la región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificada. El documento WO 94/02602 describe hospedantes mamíferos no humanos que poseen loci de Ig endógenos inactivados y loci de Ig humana funcionales. La patente de EE. UU. n.º 5.939.598 describe métodos para obtener ratones transgénicos en los que los ratones carecen de cadenas pesadas endógenas y expresan un locus de inmunoglobulina exógeno que comprende una o más regiones constantes xenogénicas. Los anticuerpos de la presente invención también pueden producirse empleando técnicas de ingeniería humanas, tal como se

analiza en la patente de EE. UU. n.º 5.766.886.

- 5 Los anticuerpos de la descripción pueden administrarse a un sujeto por medio de transferencia de genes de anticuerpos terapéuticos *in vivo*, según se analiza en Fang *et al.* (2005), Nat. Biotechnol., 23, 584-590. Por ejemplo, pueden generarse vectores recombinantes para transportar un módulo de expresión multicistrónico que comprende un péptido que media la autorruptura de polipéptidos cotraduccional independiente de enzimas, colocado entre las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera de un MAb. La expresión conduce a cantidades estequiométricas de ambas cadenas del MAb. Un ejemplo preferido del péptido que media en la autorruptura cotraduccional independiente de enzimas es el péptido 2A derivado de la enfermedad del pie y boca.
- 10 Los fragmentos de anticuerpos son adecuados para su uso en los métodos y usos de la invención, con la condición de que conserven la afinidad deseada del anticuerpo de longitud completa. Así, un fragmento de un anticuerpo anti-BPTF conservará la capacidad para unirse a BPTF. Dichos fragmentos se caracterizan por tener propiedades similares al correspondiente anticuerpo anti-BPTF de longitud completa, es decir, los fragmentos se unirán específicamente a un antígeno de BPTF humano expresado sobre la superficie de una célula humana.
- 15 En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a uno o más epitopos en un dominio de BPTF. En algunas realizaciones, los anticuerpos modulan una o más actividades biológicas relacionadas con BPTF. En algunas realizaciones, los anticuerpos inhiben uno o más del crecimiento de células cancerosas, la formación de tumores y la proliferación de células cancerosas.
- 20 Se dice que los anticuerpos "se unen específicamente" si: 1) muestran un nivel umbral de actividad de unión y/o 2) no presentan una reactividad cruzada significativa con moléculas de polipéptidos relacionadas conocidas. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante un análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci., 51: 660-672, 1949).
- 25 La descripción proporciona agentes y composiciones para su uso para tratar y/o prevenir el melanoma o los síntomas del melanoma en un sujeto, en los que el agente o las composiciones se proporcionan para la administración al sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más inhibidores de BPTF de la descripción. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer es un cáncer asociado con la sobreexpresión de BPTF. En algunas realizaciones, el cáncer está en un tejido no regulado por hormonas.
- 30 Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto inhibidor puede ser determinada de modo empírico, según procedimientos muy conocidos por los químicos farmacéuticos, y dependerá, entre otras cuestiones, de la edad del paciente, la gravedad del trastorno y de la formulación farmacéutica final deseada. La administración de los moduladores de la invención puede realizarse, por ejemplo, mediante inhalación o supositorios o a un tejido mucósico, tal como como mediante lavado del tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual, por vía oral, tópica, intranasal, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intralinfática, intratumoral, intramuscular, intersticial, intraarterial, subcutánea, intraocular, intrasinoval, transepitelial, y transdérmica. En algunas realizaciones, los inhibidores se administran mediante lavado, por vía oral o interarterial. Otros métodos adecuados para la introducción también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación lenta o sostenida. Tal como se analizó anteriormente, las composiciones terapéuticas de esta descripción también pueden administrarse como parte de una terapia de combinación con otros agentes anticáncer conocidos u otro régimen de tratamiento antienfermedades óseas.
- 35
- 40 La descripción proporciona además agentes para su uso para modular una actividad relacionada con BPTF en un paciente. Los agentes y las composiciones se proporcionan para la administración al paciente empleando una cantidad de un inhibidor de BPTF eficaz para inhibir una o más actividades biológicas de BPTF. Los ensayos adecuados para medir las actividades biológicas de BPTF se han indicado anteriormente y también se indican a continuación.
- 45 La descripción proporciona además agentes y composiciones para su uso para inhibir el crecimiento de células cancerosas en un paciente que lo necesita, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más inhibidores de BPTF al paciente. Los ensayos adecuados para medir el crecimiento de células relacionado con BPTF son conocidos por los expertos en la técnica y se han indicado anteriormente y también se indican a continuación.
- 50 La descripción proporciona además agentes y composiciones para su uso para inhibir el melanoma en un paciente que lo necesita. La idoneidad de un paciente para la terapia de BPTF se determina inicialmente como se describe en la presente (por ejemplo, cuando BPTF está sobreexpresado), y los agentes y las composiciones según se describen en la presente se proporcionan para la administración al paciente, si el paciente es un candidato para la terapia de BPTF. Si el paciente no es un candidato para la terapia de BPTF, el paciente simplemente se trató con un tratamiento convencional para el cáncer.
- 55 Los agentes y las composiciones de la presente pueden emplearse para modular uno o más síntomas del melanoma en un paciente.

Los agentes y las composiciones de la presente que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BPTF pueden emplearse para inhibir la migración de células de melanoma en paciente que lo necesita. Los ensayos adecuados para medir la migración de células relacionada con el BPTF son conocidos por los expertos en la técnica.

5 La descripción también indica que los agentes y las composiciones de la presente puedan utilizarse para tratar profilácticamente un paciente que está predispuesto a desarrollar melanoma, una metástasis de melanoma o que ha tenido metástasis y, por tanto, es susceptible a una recaída o recurrencia. Los agentes y las composiciones son particularmente útiles en individuos en alto riesgo que, por ejemplo, tienen una historia familiar de cáncer o de tumores metastatizantes, o que muestran una predisposición genética a una metástasis del cáncer. En algunas realizaciones, los tumores son tumores relacionados con BPTF. Un cáncer o tumor "relacionado con BPTF" es un
10 cáncer o tumor que muestra una mayor expresión de BPTF, comparado con el mismo tipo de células que no son de cáncer ni de tumor. Además, los agentes y las composiciones son útiles para evitar que los pacientes presenten una recurrencia de tumores relacionados con BPTF que han padecido tumores relacionados con BPTF que han sido retirados mediante extirpación quirúrgica o que han sido tratados con un tratamiento convencional para el cáncer.

15 La descripción también proporciona agentes y composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BPTF para su uso para inhibir el avance del cáncer y/o para provocar la regresión de un cáncer.

En algunas realizaciones, el paciente que necesita un tratamiento anticáncer se trata con el inhibidor de BPTF de la descripción junto con quimioterapia y/o terapia de radiación. Por ejemplo, después de la administración del inhibidor
20 de BPTF, el paciente también puede ser tratado con una cantidad terapéuticamente eficaz de radiación anticáncer. En algunas realizaciones, el tratamiento quimioterapéutico se proporciona para la administración en combinación con un inhibidor de BPTF. En algunas realizaciones, los inhibidores de BPTF se administran en combinación con quimioterapia y terapia de radiación.

Los regímenes de tratamiento pueden comprender la administración de una sola dosis o múltiples dosis de uno o más inhibidores de BPTF al paciente. En algunas realizaciones, los inhibidores de BPTF se proporcionan para la
25 administración como composiciones farmacéuticas inyectables que son estériles, apirógenas y que comprenden moduladores de BPTF en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, los regímenes terapéuticos de la descripción se emplean con regímenes de tratamiento convencionales para el cáncer que incluyen, sin limitación, cirugía, terapia de radiación, ablación hormonal y/o
30 quimioterapia. La administración de los inhibidores de BPTF de la descripción puede realizarse antes, de modo simultáneo o después del tratamiento convencional para el cáncer. En algunas realizaciones, se proporcionan dos o más inhibidores de BPTF diferentes para la administración al paciente.

En algunas realizaciones, la cantidad de inhibidor de BPTF proporcionada para la administración al paciente es eficaz para inhibir uno o más del crecimiento de células cancerosas, la formación de tumores, la proliferación de
35 células cancerosas, la metástasis de células cancerosas, la migración de células cancerosas, la angiogénesis y similares. En algunas realizaciones, la cantidad de inhibidor de BPTF proporcionada para la administración al paciente es eficaz para aumentar la muerte de células cancerosas mediante apoptosis.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona composiciones que comprenden dos o más inhibidores de BPTF para proporcionar una eficacia aún mayor contra el cáncer. En algunas realizaciones, los inhibidores de BPTF
40 son moléculas de ácidos nucleicos inhibidoras (por ejemplo, ARNhc, ARNic y moléculas antisentido) o anticuerpos inhibidores. La administración concurrente de dos o más agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o mediante la misma vía, con la condición de que se produzca un solapamiento en el periodo de tiempo durante el cual los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, así como la administración en diferentes días o semanas.

45 En algunas realizaciones, los agentes y las composiciones de la descripción son para la administración en forma de combinaciones, o "cócteles," de diferentes agentes inhibidores de BPTF.

Los agentes quimioterapéuticos que pueden emplearse en combinación con agentes inhibidores de BPTF de la descripción incluyen, sin limitación, agentes alquilantes, tales como carboplatino y cisplatino; agentes alquilantes de
50 gas mostaza; agentes alquilantes de nitrosourea, tales como carmustina (BCNU); antimetabolitos, tales como metotrexato; ácido folínico; antimetabolitos análogos de la purina, mercaptopurina; antimetabolitos análogos de la pirimidina, tales como fluorouracilo (5-FU) y gemcitabina (Gemzar®); antineoplásicos hormonales, tales como goserelina, leuprolida, y tamoxifeno; antineoplásicos naturales, tales como aldesleuquina, interleuquina-2, docetaxel, etopósido (VP-16), interferón-alfa, paclitaxel (Taxol®), y tretinoína (ATRA); antineoplásicos de antibióticos naturales, tales como bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, daunomicina y mitomicinas, que incluyen
55 mitomicina C; y antineoplásicos de vinca-alcaloides naturales, tales como vinblastina, vincristina, vindesina; hidroxiurea; aceglatona, adriamicina, ifosfamida, enocitabina, epitiostanol, aclarubicina, ancitabina, clorhidrato de procarbazona, carboquone, carboplatino, carmofur, cromomicina A3, polisacáridos antitumorales, factores de plaquetas antitumorales, ciclofosfamida (Cytosin®), esquizofilano, citarabina (citosina arabinósido), dacarbazina,

5 tiinosina, tiotepa, tegafur, dolastatinas, análogos de dolastatina, tales como auristatina, CPT-11 (irinotecano), mitozantrona, vinorelbina, tenipósido, aminopterina, caminomomicina, esperamicinas (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.675.187), neocarzinostatina, OK-432, bleomicina, furtulón, broxuridina, busulfano, honvano, peplomicina, bestatina (Ubenimex®), interferón-β, mepitiostano, mitobronitol, melfalano, péptidos de laminina, lentinano, extracto de *Coriolus versicolor*, tegafur/uracil, estramustina (estrógeno/mecloretamina).

10 Otros agentes que pueden utilizarse como terapia para pacientes con cáncer incluyen EPO, G-CSF, ganciclovir; antibióticos; leuprolida; meperidina; zidovudina (AZT); interleuquinas 1 a 18, que incluyen mutantes y análogos; interferones o citoquinas, tales como interferones alfa, beta, y gamma; hormonas, tales como la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y los análogos, y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor liberador de la hormona del crecimiento (GHRF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor homólogo del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFHF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y factor de crecimiento de insulina (IGF); factor de necrosis tumoral-α y β (TNF-α y β); factor inhibidor de la invasión-2 (IIF-2); proteínas morfogenéticas óseas 1-7 (BMP 1-7); somatostatina; timosina-alfa-1; gamma-globulina; superóxido dismutasa (SOD); factores de complemento; factores antiangiogénesis; materiales antigénicos; y profármacos. Además, un inhibidor de BPTF puede combinarse con un agente para el transporte dirigido que incluye, pero no se limita a los que se dirigen BRAF (vemurafenib o dabrafenib), MEK (trametinib), HER2 (por ejemplo, herceptina), y EGFR (por ejemplo, gefitinib). Otras combinaciones de transporte dirigido incluyen un inhibidor de BPTF y uno o más de los siguientes: Erbitux (cetuximab), Yervoy (ipilimumab) y pertuzumab. Los ejemplos de dichas terapias incluyen, sin limitación, inhibidores de quinasas de molécula pequeña, tales como Imatinib (Gleevec), Sunitinib (Sutent), Sorafenib (Nexavar), Erlotinib (Tarceva), Dasatinib (Sprycel), Nilotinib (Tasigna), Lapatinib (Tykerb), Crizotinib (Xalkori), Ruxolitinib (Jakafi), Vandetanib (Caprelsa), Pazopanib (Votrient), afatinib, alisertib, amuvatinib, axitinib, bosutinib, brivanib, canertinib, cabozantinib, cediranib, crenolanib, dacomitinib, danusertib, dovitinib, foretinib, ganetespib, ibrutinib, iniparib, lenvatinib, linifanib, linsitinib, masitinib, momelotinib, motesanib, neratinib, niraparib, oprozomib, olaparib, pictilisib, ponatinib, quizartinib, regorafenib, rigosertib, rucaparib, saracatinib, saridegib, tandutinib, tasocitinib, telatinib, tivantinib, tivozanib, tofacitinib, vatalanib, veliparib, vismodegib, volasertib, BMS-540215, BMS777607, JNJ38877605, TKI258, GDC-0941 (Folkes, *et al.*, J. Med. Chem., 2008, 51, 5522), BZE235, y otros.

30 Un profármaco se refiere a un precursor o una forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica o no citotóxica para las células tumorales, comparada con el fármaco de origen, y que es capaz de ser enzimáticamente activada o convertida en una forma activa o en la forma de origen más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986); y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero no se limitan a profármacos que contiene fosfato, profármacos que contiene tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen b-lactamas, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden transformarse en una forma de profármaco para su uso en la presente incluyen, pero no se limitan a los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

45 La descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los inhibidores de BPTF descritos en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se preparan como inyectables, como disoluciones o como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución o la suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas se incluyen dentro de la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. También pueden estar presentes sales farmacéuticamente aceptables en la composición farmacéutica, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Está disponible un profundo análisis de los excipientes farmacéuticamente aceptables en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995), Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkins.

La descripción también proporciona métodos para detectar el BPTF. En algunas realizaciones, el BPTF puede detectarse en una muestra de un paciente *in vitro*.

55 La descripción también proporciona métodos para formar imágenes/detectar células o tumores que expresan o sobreexpresan BPTF, que comprende poner en contacto una composición que comprende un agente (por ejemplo, un ácido nucleico o un anticuerpo) que se une a BPTF, con una muestra, y detectar la presencia del BPTF en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de un paciente. En algunas realizaciones, la muestra del paciente comprende células de cáncer.

60 Los métodos de detección son muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los métodos para detectar polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a PCR, análisis de la transferencia Northern, análisis de la transferencia Southern, protección de ARN e hibridación de ADN (que incluye hibridación *in situ*). Los métodos para detectar

polipéptidos incluyen, pero no se limitan a análisis de la transferencia Western, ELISA, ensayos de actividad enzimática, análisis de la transferencia de ranuras, huellas de masas de péptidos, electroforesis, inmunquímica e inmunohistoquímica. Otros ejemplos de métodos de detección incluyen, pero no se limitan a radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo de quimioluminiscencia, fluoroinmunoensayo, fluoroinmunoensayo resuelto en el tiempo (TR-FIA), microscopía fluorescente de dos colores, o ensayo inmunocromatográfico (ICA), todos ellos muy conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la expresión del polinucleótido se detecta empleando metodologías de PCR, y la producción de polipéptidos se detecta empleando la tecnología de ELISA.

Pueden producirse sondas adecuadas para la hibridación de transferencia Northern de un ácido nucleico concreto a partir de secuencias de ácidos nucleicos de BPTF (por ejemplo, SEQ ID NO:1). Los métodos para la preparación de sondas de ADN y ARN marcadas y sus condiciones de hibridación para dirigirse a secuencias de nucleótidos se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, capítulos 10 y 11.

En un ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede marcarse, por ejemplo, con un radionúclido, tal como ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , o ^{35}S ; un metal pesado; o un ligando capaz de actuar como un miembro de una pareja de unión específica para un ligando marcado (por ejemplo, biotina, avidina o un anticuerpo), una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente o una enzima. Las sondas pueden marcarse para una alta actividad específica mediante traducción de desplazamiento de mella, cebado aleatorio u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, mediante la sustitución de nucleótidos preexistente por nucleótidos muy radiactivos según el método de traducción de desplazamiento de mella, se sabe que pueden prepararse sondas de ácidos nucleicos marcadas con ^{32}P con una actividad específica bastante mayor que 10^8 cpm/microgramo.

Después puede realizarse la detección autorradiográfica de la hibridación exponiendo los filtros hibridados a una película fotográfica. El barrido densitométrico de las películas fotográficas expuestas por los filtros hibridados proporciona una medición precisa de los niveles de transcritos de miARN. En otra realización, los niveles de transcritos de genes pueden cuantificarse mediante sistemas de formación de imágenes por ordenador, tales como Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager, disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.

En otra realización, puede emplearse el método de cebador aleatorio para incorporar un análogo, por ejemplo, el análogo de dTTP 5-{N-(N-biotinil-épsilon-aminocaproil)-3-aminoalil}desoxiuridina trifosfato, en la molécula de la sonda. El oligonucleótido de la sonda biotinilado puede detectarse mediante una reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina, y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos antibiotina) acoplados a tintes fluorescentes o enzimas que produce reacciones de color.

En otra realización, la determinación de los niveles de expresión puede lograrse empleando la técnica de la hibridación *in situ*. Esta técnica requiere menos células que la técnica de la transferencia Northern e implica depositar células enteras sobre un cubreobjetos para microscopio y sondar el contenido en ácidos nucleicos de la célula con una disolución que contiene sondas de un ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ARN) radiactivo o marcado de otra forma. Esta técnica resulta particularmente adecuada para analizar muestras de biopsias de tejidos procedentes de sujetos. La práctica de la técnica de la hibridación *in situ* se describe con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 5.427.916.

El número relativo de transcritos de genes en células también puede determinarse mediante la transcripción inversa de transcritos de genes, seguido de la amplificación de los transcritos inversos mediante una reacción en cadena con polimerasa (RT-PCR). Los niveles de los transcritos de los genes pueden cuantificarse por comparación con un patrón interno, por ejemplo, el nivel de ARNm de un gen "constitutivo" presente en la misma muestra. Un gen "constitutivo" adecuado para su uso como patrón interno incluye, por ejemplo, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los métodos para la RT-PCR cuantitativa y sus variaciones están dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica. En otra realización, se emplea una reacción en cadena con polimerasa cuantitativa a tiempo real de tallo-bucle de alta capacidad de procesamiento (RT-qPCR) para detectar la expresión de miARN. Véase Mestdagh *et al.*, *Nucleic Acid Research*, 36(21) (2008).

Un "perfil de expresión" o "perfil de hibridación" de una muestra concreta es fundamentalmente una huella del estado de la muestra; mientras que dos estados pueden presentar cualquier gen concreto expresado de modo similar, la evaluación de una serie de genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión de genes que es exclusivo del estado de la célula. Es decir, el tejido normal puede distinguirse de un tejido de cáncer y, dentro de un tejido de cáncer, pueden determinarse diferentes estados de prognosis (perspectivas buenas o malas de supervivencia a largo plazo). Mediante la comparación de los perfiles de expresión de un tejido de cáncer en diferentes estadios se obtiene información acerca de los genes que son importantes (que incluye la infra- y sobrerregulación de genes) en cada uno de los estadios. La identificación de secuencias que se expresan de modo diferencial en un tejido de cáncer o en el tejido normal, así como la expresión diferencial que provoca diferentes resultados de pronóstico, permite emplear esta información de una serie de formas. Por ejemplo, puede evaluarse un régimen de tratamiento concreto (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico actúa para mejorar la prognosis a largo plazo en un paciente concreto). De forma similar, puede realizarse un diagnóstico o confirmarse comparando muestras de pacientes con los perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión de genes (o genes individuales) permiten la selección de candidatos a fármacos que suprimen el perfil de

expresión del cáncer o que convierten un perfil de prognosis malo en un perfil de prognosis mejor.

Según los métodos de realización de perfiles de expresión descritos en la presente, el ARN total de una muestra procedente de un sujeto sospechoso de padecer melanoma se somete cuantitativamente a transcripción inversa para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementarios con el ARN en la muestra. Los oligodesoxinucleótidos diana entonces se hibridan con una micromatriz que comprende sondas oligonucleotídicas específicas de ARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra. El resultado es un perfil de hibridación para la muestra que representa el patrón de expresión de genes en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal procedente de la unión de los oligodesoxinucleótidos diana procedentes de la muestra a las sondas oligonucleotídicas específicas de BPTF en la micromatriz. El perfil puede registrarse como la presencia o la ausencia de unión (señal frente a señal cero). Generalmente, el perfil registrado incluye la intensidad de la señal de cada hibridación. El perfil se compara con el perfil de hibridación generado a partir de una muestra control. Una alteración en la señal es indicativa de una respuesta de quimioterapia en el sujeto.

Otras técnicas para medir la expresión de genes también se encuentran dentro de los conocimientos de la técnica e incluyen diversas técnicas para medir las tasas de transcripción y degradación del ARN, que incluyen ensayos de protección de ARNasas, ensayos nucleares, análisis de la transferencia de ranuras, etc.

En otra realización, la descripción proporciona un método para pronosticar la presencia de un melanoma en un sujeto. El método comprende la etapa de determinar si BPTF está o no sobreexpresado o infraexpresado en una muestra biológica procedente del sujeto, con relación a la expresión de BPTF de una o más muestras control. En una realización particular, el nivel de sobreexpresión de BPTF procedente de una muestra biológica del sujeto, en comparación con una muestra biológica control, indica si la muestra del sujeto es maligna.

En otra realización, la descripción proporciona un método para determinar el avance del melanoma en un sujeto. El método comprende la etapa de medir el nivel de expresión del BPTF procedente de muestras biológicas tomadas de un paciente que padece melanoma en diversos momentos, de tal forma que el cambio en el nivel de expresión de BPTF entre las muestras de diferentes momentos indica el avance o la recuperación del cáncer en el sujeto. En una realización particular, si el nivel de expresión de BPTF aumenta entre los momentos más tempranos y momentos posteriores, esto indica que el cáncer del sujeto está avanzando hasta estadios posteriores del cáncer. En una realización alternativa, si el nivel de expresión de BPTF disminuye entre los momentos más tempranos y momentos posteriores, esto indica que el melanoma del sujeto está en proceso de remisión.

Los términos "tratar" y "tratamiento", tal como se emplean en la presente, se refieren a mejorar los síntomas asociados con una enfermedad o un trastorno, por ejemplo, un melanoma, que incluyen prevenir o retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad y/o disminuir la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad o el trastorno. Los términos "sujeto" e "individuo" se definen en la presente para incluir animales, tales como mamíferos, que incluyen, pero no se limitan a primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedores o murinas. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

Tal como se emplea en la presente, una "cantidad eficaz" de un inhibidor de BPTF es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación o la invasividad de una célula cancerosa en un sujeto que padece un cáncer. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad una cantidad eficaz de un inhibidor de BPTF que se va a administrar a un sujeto concreto tomando en cuenta factores tales como el tamaño y el peso del sujeto; el grado de penetración de la enfermedad; la edad, la salud y el sexo del sujeto; la vía de administración; y si la administración es regional o sistémica.

Los cánceres que pueden ser tratados mediante las composiciones que comprenden polinucleótidos que comprenden agentes inhibidores de BPTF y/o agentes que disminuyen la expresión de BPTF incluyen tumores que no están vascularizados o que no están aún sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden estar formados por tumores no sólidos (tales como leucemias y linfomas) o pueden ser tumores sólidos.

En una realización particular, la descripción proporciona agentes y composiciones para su uso para tratar el melanoma en un sujeto, comprendiendo dicho agente o composición una cantidad eficaz de un agente que inhibe la expresión o la actividad del BPTF. En otra realización, el agente es un ARNhc. En otra realización, el agente es un imitador de miARN bicatenario. La tecnología de los imitadores de miARN es muy conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Wang, Z., 2009, miRNA mimic technology, en *MicroRNA Interference Technologies*, pp. 93-100, Springer-Link Publications. En otra realización, el agente es un fármaco de BPTF basado en oligonucleótidos.

Los vectores de expresión que codifican moléculas de ARNhc o miARN para producir BPTF pueden administrarse a células de un sujeto para el tratamiento o la prevención de un cáncer. Las moléculas de ácidos nucleicos se transportan a las células de un sujeto en una forma en que puedan ser captadas y expresadas de modo ventajoso, de modo que puedan alcanzarse unos niveles terapéuticamente eficaces. Los vectores de expresión que son capaces de expresar ARNhc de BPTF están disponibles en el mercado de diversos suministradores.

Los métodos para transportar polinucleótidos que comprenden agentes de ácidos nucleicos inhibidores que disminuyen la expresión de BPTF a una célula incluyen un sistema de transporte, tal como liposomas, polímeros, microesferas, vectores de terapia génica, ácidos nucleicos modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos con carga neutralizada) y vectores de ADN desnudos.

- 5 Pueden emplearse vectores víricos transductores (por ejemplo, retrovíricos, adenovíricos, lentivíricos y víricos adenoasociados) para la terapia génica de células somáticas, en especial debido a su elevada eficacia de infección y la integración y expresión estables (véase, por ejemplo, Cayouette *et al.*, *Human Gene Therapy*, 8:423-430 (1997); Kido *et al.*, *Current Eye Research*, 15:833-844 (1996); Bloomer *et al.*, *Journal of Virology*, 71:6641-6649 (1997); Naldini *et al.*, *Science*, 272:263-267 (1996); y Miyoshi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:10319 (1997)). Por
10 ejemplo, un polinucleótido que codifica un ácido nucleico inhibidor de BPTF puede clonarse en un vector retroviral y su expresión puede ser dirigida por un promotor endógeno, por la repetición terminal larga retroviral o por un promotor específico de un tipo de célula diana de interés. Otros vectores víricos que pueden emplearse incluyen, por ejemplo, un virus de vaccinia, un virus de papiloma bovino, o un herpes virus, tal como el virus de Epstein-Barr (véanse también, por ejemplo, los vectores de Miller, *Human Gene Therapy*, 15-14, (1990); Friedman, *Science*,
15 244:1275-1281 (1989); Eglitis *et al.*, *BioTechniques*, 6:608-614 (1988); Tolstoshev *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology*, 1:55-61 (1990); Sharp, *The Lancet*, 337:1277-1278 (1991); Cornetta *et al.*, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 36(31):1-322 (1987); Anderson, *Science*, 226:401- 409 (1984); Moen, *Blood Cells*, 17:407-416 (1991); Miller *et al.*, *Biotechnology*, 7:980-990 (1989); Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990 (1993); y Johnson, *Chest*, 107:77S-83S (1995)). Los vectores retrovíricos están particularmente bien desarrollados y se han
20 empleado en entornos clínicos (Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 323:370 (1990); Anderson *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.399.346; Gruber *et al.*, publicación de patente de EE. UU. n.º 2011/0287020A1). También pueden emplearse estrategias no víricas para la introducción de un producto terapéutico basado en un ácido nucleico inhibidor de BPTF en una célula de un paciente diagnosticado con una neoplasia. Por ejemplo, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico inhibidor de BPTF puede introducirse en una célula administrando el ácido nucleico en
25 presencia de lípidos catiónicos (Feigner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 84:7413 (1987); Ono *et al.*, *Neuroscience Letters*, 17:259 (1990); Brigham *et al.*, *Am. J. Med. Sci.*, 298:278 (1989); y Staubinger *et al.*, *Methods in Enzymology*, 101:512 (1983)); conjugación de asialo-orosoinuocido-polilisina (Wu *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 263:14621 (1988); Wu *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 264:16985 (1989); o mediante microinyección bajo condiciones quirúrgicas (Wolff *et al.*, *Science*, 247:1465 (1990)). Un polinucleótido que comprende un ácido nucleico inhibidor de BPTF y/o un agente que inhibe la expresión de BPTF puede administrarse en combinación con un liposoma y protamina.

En otra realización, la descripción proporciona composiciones terapéuticas que comprenden polinucleótidos que comprenden un ácido nucleico inhibidor de BPTF que inhibe la expresión de BPTF para el tratamiento del melanoma. En otra realización, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente
35 que inhibe la expresión de BPTF.

Los polinucleótidos que comprenden un ácido nucleico inhibidor de BPTF y/o agentes que inhiben la expresión de BPTF pueden administrarse como parte de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica es preferiblemente estéril y contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de polinucleótido que comprende un ácido nucleico inhibidor de BPTF y/o un agente que inhibe la expresión de BPTF en una unidad de
40 peso o volumen adecuada para la administración a un sujeto.

La molécula de polinucleótido terapéutica que comprende un ácido nucleico inhibidor de BPTF y/o agentes que inhiben la expresión de BPTF puede administrarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una forma de dosificación unitaria. Puede emplearse la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar los compuestos a pacientes que padecen un cáncer.

45 Los vehículos, tal como se emplean en la presente, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a ellos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa con pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso
50 molecular (menor que aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

Los polinucleótidos que comprenden un ácido nucleico inhibidor de BPTF y/o agentes que inhiben la expresión de BPTF también pueden atraparse dentro de microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de transporte de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra con facilidad mediante filtración a
60

través de membranas de filtración estériles. Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que comprenden un polinucleótido que comprende un ácido nucleico inhibidor de BPTF y/o un agente que inhibe la expresión de BPTF, y dichas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (la patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros del ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan las moléculas durante periodos de tiempo más cortos.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden polinucleótidos que comprenden un ácido nucleico inhibidor de BPTF y/o agentes que inhiben la expresión de BPTF se administran junto con otros agentes terapéuticos. "Junto con", con respecto a la administración de otros agentes terapéuticos, se refiere a agentes que pueden administrarse antes, al mismo tiempo o después de las composiciones farmacéuticas que comprenden polinucleótidos que comprenden un ácido nucleico inhibidor de BPTF y/o agentes que inhiben la expresión de BPTF.

Ejemplos

Cultivo celular y transfección. Las células C8161.9 y 1205-Lu de melanoma humano y B16-F10 de melanoma murino se obtuvieron como se ha descrito (Bagheri *et al.*, 2006; Dar *et al.*, 2011). Las líneas de células U251 y LN18 de glioblastoma se adquirieron en ATCC (Manassas, VA). Las células C8161.9 se cultivaron en DMEM/F12 con suero bovino fetal al 5% (FBS) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA); las células 1205-Lu se cultivaron en medio TU al 2%; y las células B16-F10 se cultivaron en RPMI-1640 con FBS al 5%. U251 y LN18 se cultivaron en DMEM con FBS al 5%. Todas las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 5%. La transfección transitoria se realizó con Lipofectamine-2000 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante.

Plásmidos. Los plásmidos pcMV6-BPTF, pcMV6-Entry y el conjunto de vectores de ARNhc dirigidos a BPTF (4 clones) pGFP-V-RS se adquirieron en Origene (Origene Technologies Rockville MD). El ARNhc 1 de BPTF y el ARNhc 2 de BPTF empleados procedían de este conjunto para la línea de células murinas. El conjunto de vectores de ARNhc basados en lentivirus (5 clones) que se dirigen a BPTF (RHS4533_NM_0059) se adquirieron en Openbiosystems (Lafayette, CO).

Extracción de ARN y síntesis de ADNc. La extracción del ARN y la síntesis de ADNc se realizaron empleando técnicas habituales en la técnica.

PCR a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). Los ARNm se ensayaron empleando los ensayos de expresión génica TaqMan según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Se adquirieron las sondas TaqMan para BPTF, HPRT1, CCND2, BCL-XL, TWIST1, RAB14, CEBPB, CHI3L1, DLL3, OLIG2, PDGFRA y BCL2 en Applied Biosystems (Foster City, CA).

Viabilidad celular, formación de colonias, análisis del ciclo celular y tratamiento con inhibidor de BRAF. Se realizó el análisis de la viabilidad celular, de formación de colonias y del ciclo celular como se ha descrito empleando técnicas habituales en la técnica. Las células se trataron con concentraciones variables de vemurafenib durante 72 hr o dabrafenib (Chemitek, Indianápolis, IN) durante 48 hr o como se indica. Se empleó DMSO como vehículo.

Análisis de la transferencia Western. Se realizó un análisis de la transferencia Western. Se detectaron las proteínas diana empleando anticuerpos específicos contra BPTF (Bethyl Laboratories Montgomery, TX), BCL2, y GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y ERK1/2, pERK1/2, CCND2, BCL-XL, p90RSK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

Transducción lentivírica y generación de células estables. Los ARNhc seleccionados clonados en el vector pLKO1 se cotransfectaron en células 293T junto con vectores de expresión que contienen los genes GAG/POL, REV y VSVG. Los lentivirus se recolectaron 48 hr después de la transfección. Se infectaron células de melanoma o glioblastoma humanas subconfluentes con cada lentivirus recolectado en presencia de 8 μ g/ml de polibreno, y se seleccionaron en 1 μ g/ml de puomicina 48 hr después de la infección en su respectivo medio de cultivo. Células B16-F10 fueron transfectadas con vectores de ARNhc 1 de BPTF, ARNhc 2 de BPTF o ARNhc Neg y los transformantes estables se seleccionaron con 2 μ g/ml de puomicina.

Ensayos de invasión. Se realizó un ensayo de Matrigel para la invasión tumoral empleando técnicas habituales. Para las células B16-F10, 1205-Lu y C8161.9, se revistieron cámaras insertadas con 15 μ l de Matrigel a 6 mg/ml de proteína, 17 μ l y 7 mg/ml para células C8161.9, y 15 μ l y 5 mg/ml para las líneas celulares 1205-Lu y U251.

Cuantificación de la sensibilidad a ADNasa I. Las células se recolectaron y se resuspendieron en tampón de lisis enfriado en hielo (KCl 100 mM, Tris-Cl 50 mM [pH 7,9], glicerol al 50% [en vol/vol], β -mercaptoetanol 200 mM, y

MgCl₂ 5 mM) y se incubaron durante 10 minutos. Los núcleos fueron recuperados de las células lisadas sometiendo la suspensión a una centrifugación a 13.000 g durante 15 minutos a 4 °C y resuspendiendo las células en tampón A (Tris-Cl 50 mM [pH 7,9], MgCl₂ 3 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,2 mM, NaCl 100 mM, y ditiotreitolo 1 mM). Los núcleos se digirieron con ADNasa I durante 3 minutos a temperatura ambiente en tampón A. Las muestras después se trataron con proteinasa K y el ADN se recuperó empleando el kit de purificación QIAGEN PCR (Qiagen, Valencia, CA). El ADN tratado con ADNasa se sometió a una qPCR empleando cebadores específicos para BCL2 y BCL-XL.

Matrices de tejidos e inmunotinción. Las micromatrices de tejidos se crearon previamente empleando unos diámetros centrales de 1,0 mm tomados de bloques de parafina. Se prepararon portaobjetos a partir de las micromatrices de tejidos fijadas en formol y se tiñeron con anticuerpo anti-BPTF humano a una dilución de 1:100 (Bethyl Laboratories Montgomery, TX). La retirada del antígeno con microondas se realizó en tampón citrato 10 mM, pH 6,0. La peroxidasa endógena se bloqueó con H₂O₂ al 3%, y se realizó un bloqueo adicional con suero de conejo normal. El anticuerpo primario se diluyó en BSA al 1,0% en PBS y se aplicó durante la noche a 4 °C. La tinción de anticuerpos se observó empleando un anti-IgG de cabra marcado con biotina y avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA), seguido de diaminobenzidina. Las secciones se contratificaron con hematoxilina.

Evaluación digital de la tinción inmunohistoquímica. Se capturaron imágenes de los portaobjetos completos de secciones de micromatrices de tejidos empleando un sistema de barrido de alta resolución Mirax MIDI (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Alemania). El proceso de digitalización se controló mediante un programa informático empleando una cámara Marlin CCD (Allied Vision Technologies GmbH, Alemania) con un objetivo Zeiss Plan-Apochromat 20x/0.8NA (Carl Zeiss Optonics GmbH, Oberkochen, Alemania) para generar imágenes a una resolución de 0,32 micrómetros/píxel. Las regiones con una lesión melanocítica identificable se seleccionaron para la evaluación, y la tinción inmunohistoquímica se calculó aplicando una característica de segmentación con dos máscaras de medición de fase diferentes que reconocen los núcleos (teñidos con hematoxilina) y el citoplasma (inmunoteñido de marrón). El análisis de las imágenes se realizó mediante segmentación de color asistida por ordenador para determinar el porcentaje de píxeles positivos que expresan color. Para cada píxel positivo se calculó la intensidad (defina como el promedio de los valores del color rojo, verde y azul) para posteriores análisis. Los métodos estadísticos empleados para evaluar la significancia de diversos factores de pronóstico sobre las consecuencias del melanoma se han descrito previamente (Bagheri *et al.*, 2006).

Obtención del perfil de expresión de genes. El ARN total se extrajo de las células empleando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Diez microgramos del ARN total, junto con un ARN de referencia de ratón universal (Stratagene, Santa Clara, CA), se convirtieron en ADNc modificado con aminoalilo mediante polimerización cebada con oligo (dT) empleando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), se acopló a ZV-ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo de Cy3 o Cy5 (Amersham Pharmacia, Pittsburgh, PA), y después se hibridó con un portaobjetos de micromatriz según se ha descrito (Haqq *et al.*, 2005). Después de una normalización lineal, una transformación logarítmica (de base 2) y un agrupamiento jerárquico supervisado, la tabla de datos de agrupamiento resultante se importó al análisis de la significancia del paquete de software de las micromatrices. Se eligió delta para limitar la lista de resultados de los genes para incluir 5% de falsos positivos predichos.

FISH y microscopía. Se emplearon los clones BAC RP11-304114, RP11-1134M2, RP11-29C18 y CTD-2314M10 para detectar el locus de BPTF en 17q24.3 (February 2009 freeze of the UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>). Todos los clones se obtuvieron de the Children's Hospital of Oakland Research Institute (CHORI). El ADN de BAC se preparó con el kit Large-Construct (Qiagen, Valencia, CA) y se marcó con traducción de desplazamiento de mella con dUTP de Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Green Island, NY) según se ha descrito (Wiegant y Raap, 2001). Se verificó la calidad y el cartografiado de todas las sondas mediante hibridación con dispersiones de cromosomas en metafase normales en combinación con una sonda centromérica disponible en el mercado para el cromosoma 17 (Openbiosystems, Lafayette, CO), antes del análisis del tejido. La hibridación de las secciones de tejidos se realizó como se ha descrito previamente (Wiegant y Raap, 2001). Las imágenes se tomaron con un Zeiss Axio Imager Z2 controlado por el software Axiovision (Zeiss, Jena, Alemania).

Análisis de los resultados de FISH. Las señales de FISH se evaluaron y se contaron a mano a partir de las imágenes con varias capas de apilamiento de Z. Se evaluó un mínimo de 30 núcleos procedentes de cada caso, y las señales se interpretaron según las líneas directrices descritas previamente (Munne *et al.*, 1998) y se registraron como 2, 3, 4, o mayor.

Estudios en animales. Todos los cuidados animales se realizaron según las directrices institucionales y un protocolo que ha sido aprobado por the University of California San Francisco Committee on Animal Research and California Pacific Medical Center Research Institute. Grupos de ratones C57B1/6 hembra de 45 días de edad (Charles River) fueron inoculados mediante una inyección en la vena de la cola con 30.000 células B16-F10 BPTF estables. Se inyectaron 1x10⁶ células 1205-Lu en la vena de la cola de ratones atímicos ("nude"). Para la inyección subcutánea, se inyectaron 1x10⁶ células 1205-Lu, B16-F10, o C8161.9 células y 2x10⁶ células U251, respectivamente.

Análisis estadístico. Todos los datos cuantificados representan un promedio de muestras al menos por triplicado o según se indica. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio. La significancia estadística fue determinada por el ensayo de la t de Student o el ensayo de Mann-Whitney, y unos valores de p de dos colas <0,05 fueron considerados significativos.

La inactivación de BPTF suprime la proliferación, el crecimiento *in vivo* y el potencial metastásico del melanoma murino. El papel funcional del BPTF en el melanoma se evaluó inicialmente empleando el transporte dirigido mediado por ARNhc en el modelo de melanoma murino B16-F10. La expresión de BPTF fue suprimida significativamente por dos ARNhc anti-BPTF diferentes (1 y 2), según se determina mediante una PCR a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) (figura 1A). La supresión mediada por ARNhc de la expresión de BPTF suprime sustancialmente la capacidad proliferativa de las células B16-F10 cuando se compara con un ARNhc control (figura 1B). Las células que expresan ARNhc de BPTF también muestran una invasión significativamente reducida hacia Matrigel®, cuando se comparan con células que expresan ARNhc control (figura 7A). La inyección subcutánea de células que expresan ARNhc de BPTF muestra una significativa supresión en el crecimiento de células tumorales (figura 1C). La inoculación intravenosa de ARNhc de BPTF en ratones C57B1/6 mostró una reducción muy significativa del recuento tumoral metastásico en los pulmones (figura 1D). Estos resultados demuestran un papel significativo del BPTF en el potencial proliferativo y metastásico del melanoma.

Debido al papel no caracterizado del BPTF en el cáncer, se realizaron análisis de micromatrices de ADNc para identificar los patrones globales de expresión génica tras la supresión de la expresión de BPTF. Se realizaron análisis de micromatrices de ADNc con clones de B16-F10 que expresan de modo estable el ARNhc 2 de BPTF frente al vector control. El análisis de las micromatrices identificó la infrarregulación de la expresión de 27 genes, así como la sobreexpresión de 1008 genes. Los genes infrarregulados incluyen Bcl-x1 y Ccnd2, que son mediadores cruciales de la proliferación de células tumorales y la apoptosis. La expresión diferencial de estos genes (así como de Bcl-2) en el melanoma B16-F10 se confirmó mediante qRT-PCR y mediante análisis de la transferencia Western (figura 1E-F).

La inactivación de BPTF suprime la proliferación, el crecimiento *in vivo* y el potencial metastásico del melanoma humano. Tras haber demostrado un papel funcional del BPTF en células de melanoma murino, se analizó el papel en el avance del melanoma humano. El establecimiento de BPTF como objetivo utilizando un ARNhc diferente (ARNhc 3 de BPTF) que el empleado para los estudios murinos produjo una significativa supresión de la expresión de BPTF en células de melanoma humano 1205-Lu, que portan un BRAF mutante (figura 2A). La supresión de BPTF condujo a la detención del ciclo celular en G1/G0 y a una significativa reducción en la fase S cuando se compara con el vector de ARNhc control (figura 2B). La inactivación del BPTF produjo un efecto significativo sobre la capacidad proliferativa de las células de melanoma, según se evidencia por la supresión de la supervivencia de las células (figura 2C) y la capacidad de formación de colonias (figura 2D, $p < 0,02$), y vino acompañado de un índice apoptótico significativamente aumentado en las células 1205-Lu (figura 2E, $p < 0,02$). Se observaron efectos similares sobre la proliferación y la supervivencia de las células de melanoma empleando otros dos ARNhc dirigidos al BPTF humano. La supresión de BPTF también condujo a una disminución significativa en la invasividad de 1205-Lu hacia Matrigel® (figura 7B). El crecimiento de células tumorales subcutáneas en ratones atímicos también fue considerablemente suprimido en las células que expresan ARNhc de BPTF cuando se comparan con las células que expresan ARNhc control (figura 2F). Por último, la supresión de la expresión de BPTF produjo una reducción del 66% en la carga tumoral metastásica en los pulmones de ratones atímicos tras la inoculación intravenosa de células 1205-Lu (figura 2G). Estos efectos antitumorales fueron confirmados tras la supresión mediada por ARNhc de BPTF en la línea de células de melanoma C8161.9 muy agresivas, que portan BRAF de tipo salvaje (figura 8A-E). Tomados conjuntamente, estos estudios demuestran que el BPTF desempeña un papel importante en la estimulación del potencial proliferativo y metastásico de líneas de células de melanoma mutantes y de tipo salvaje con BRAF.

El BPTF regula la expresión de BCL2, BCL-XL, CCND2, y de la vía de ERK1/2. FAC1, la forma truncada de BPTF, muestra una actividad de unión al ADN específica de secuencia. El análisis de las regiones de promotores de BCL2 y BCL-XL indica la presencia de posibles secuencias consenso para BPTF. La sensibilidad al tratamiento con ADNasa I en las regiones de promotores de estos genes se evaluó en dos líneas de células de melanoma humanas que expresan de modo estable ARNhc de BPTF frente al control. La hipersensibilidad a la ADNasa I puede ser debida a la unión de factores de transcripción o a cambios en la colocación o la compactación de los nucleosomas (Gross y Garrard, 1988). Empleando un análisis de qPCR, se cuantificaron las regiones del ADN que contienen los sitios de unión a BPTF putativos dentro de BCL2 y BCL-XL, y se descubrió que estaban presentes a unos niveles sustancialmente reducidos en las células de melanoma humano 1205-Lu y C8161.9 que expresan ARNhc de BPTF (figura 3A-B). Así, las regiones de promotores de BCL2 y BCL-XL muestran una mayor sensibilidad al tratamiento con ADNasa I en células de melanoma humano con una expresión de BPTF reducida. Entonces se confirmó la infrarregulación de estos genes al nivel de ARNm en células de melanoma humano tras la expresión de ARNhc de BPTF (figura 3C-D). Puesto que estos genes median en vías que promueven la supervivencia, se estudiaron las vías de señalización proliferativa reguladas por la expresión de BPTF, y se observó una supresión sustancial en los niveles de pERK1/2 (Thr202/Tyr204) en células de melanoma que expresan ARNhc de BPTF (figura 3E-F). p90RSK (Ser380), la diana corriente abajo de pERK, también fue suprimida por la inactivación de BPTF. BCL2 y BCL-XL, que representan otros efectores de la vía de ERK (Boucher *et al.*, 2000), también fueron modulados por la inactivación de BPTF, además de CCND2, en las células de melanoma humano 1205-Lu y C8161.9 (figura 3E-F). La sobreexpresión del ADNc de ERK1/2 o BCL-XL en células de melanoma que expresan de modo estable ARNhc de BPTF revirtió la supresión en la supervivencia celular tras la inactivación de BPTF, lo cual indica que la función proliferativa del BPTF está mediada, al menos en parte, por ERK1/2 y BCL-XL (figura 9).

A la inversa, la sobreexpresión de BPTF en células 1205-Lu dio como resultado una capacidad proliferativa

significativamente aumentada (figura 10A), y fue acompañada por una sobrerregulación en la expresión de CCND2, BCL-XL y BCL2 al nivel de ARNm y de proteínas (figura 10 B-C).

Quantificación de los niveles de BPTF en neoplasmas melanocíticos. Tras haber determinado los papeles funcionales de BPTF en la estimulación de la proliferación y la metástasis del melanoma murino y humano, se realizó un análisis inmunohistoquímico de la expresión de BPTF en una cohorte de micromatrices de tejidos de 311 pacientes humanos con melanoma (Rangel *et al.*, 2006), y se cuantificaron los niveles de BPTF (figura 11) empleando un análisis de formación de imágenes digitales (Kashani-Sabet *et al.*, 2009). Mediante un análisis de Kaplan-Meier, unos niveles altos de expresión de BPTF fueron significativamente predictivos de una menor supervivencia sin metástasis distantes (DMFS, $p = 0,03$, figura 4A) y supervivencia específica de enfermedad (DSS, $p = 0,008$, figura 4B). Mediante un análisis de la regresión Cox multivariante, se determinó que el aumento de la expresión de BPTF era una variable predictiva independiente de DMFS (tabla 1) y DSS (tabla 2). Así, la sobreexpresión de BPTF se correlaciona directamente con el desarrollo de metástasis distantes y con una menor supervivencia en el melanoma humano, y es una variable predictiva independiente de la supervivencia.

Tabla 1 - Análisis de la regresión Cox multivariante del impacto de diversos factores de pronóstico sobre la supervivencia sin metástasis distantes en una cohorte de melanoma

<u>Factor de pronóstico</u>	<u>Chi-cuadrado</u>	<u>Tasa de riesgo</u>	<u>Valor de p</u>
Espesor del tumor	12,3	1,51	0,0005
Nivel de expresión de BPTF	7,64	1,01	0,0057
Ulceración	4,72	1,57	0,03
Tasa mitótica	4,35	1,05	0,037
Sitio	1,25	1,25	0,26
Sexo	0,1	0,98	0,75
Edad	0,30	1,12	0,59

Tabla 2 - Análisis de la regresión Cox multivariante del impacto de diversos factores de pronóstico sobre la supervivencia específica de enfermedad en una cohorte de melanoma

<u>Factor de pronóstico</u>	<u>Chi-cuadrado</u>	<u>Tasa de riesgo</u>	<u>Valor de p</u>
Espesor del tumor	12,4	1,56	0,0004
Nivel de expresión de BPTF	7,49	1,01	0,0062
Ulceración	5,26	1,06	0,02
Tasa mitótica	2,85	1,46	0,09
Sitio	0,30	1,12	0,58
Sexo	0,01	0,98	0,92
Edad	0,19	1,03	0,66

Para determinar el número de copias de BPTF en el melanoma, se realizó una hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH) en interfase de 81 muestras de nevus benigno y 77 de melanomas primarios. Todos los nevi portan 2 copias del gen BPTF, mientras que 64% de los melanomas portan más de 2 copias (de 2 a 2,9 copias), 22% portan más de 3 copias (de 3 a 3,9 copias), y 14% portan más de 4 copias (tabla 3). La figura 4C-D muestra fotomicrografías de FISH representativas que ilustran el alto y bajo número de copias de BPTF. Estos descubrimientos indican que el número de copias de BPTF es elevado en una proporción significativa de melanomas primarios, lo cual apoya aún más su papel oncogénico.

Tabla 3 - Número de copias de BPTF en muestras de melanoma y nevi

Nevi		
Número de copias	Casos	%
2	81	100
Melanoma		
Número de copias	Casos	%
2	49	64
3	17	22
4	11	14

5 El BPTF regula la sensibilidad a inhibidores de BRAF selectivos. ERK1/2 es una diana corriente abajo de BRAF dentro de la vía de MAP quinasas, y se suprime significativamente tras un tratamiento con inhibidores de BRAF selectivos (Greger *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2010). Dada la infrarregulación del ERK1/2 activado después de una supresión mediada por ARNhc del BPTF en células de melanoma humano, se evaluó el nivel de expresión de BPTF para determinar la sensibilidad a inhibidores de BRAF selectivos. Las células 1205-Lu que expresan ARNhc de BPTF fueron 3,2 más sensibles al tratamiento con vemurafenib (figura 5A), y 2,8 más sensibles al tratamiento con dabrafenib (figura 5B), cuando se comparan con células que expresan ARNhc control. A la inversa, la sobreexpresión de BPTF en células 1205-Lu redujo significativamente su sensibilidad al tratamiento con vemurafenib o dabrafenib (en 2,5 a 3,4 veces, respectivamente) (figura 5C-D). La regulación de la sensibilidad de las células de melanoma humano a la inhibición de BRAF selectiva tras la modulación de la expresión de BPTF fue confirmada en la línea de células LOX que expresa BRAF mutante (figura 12).

15 Además, las muestras adquiridas de ocho pacientes con melanoma metastásico antes de iniciar y después de recibir los inhibidores de BRAF selectivos vemurafenib o dabrafenib se sometieron a una genotipificación, una tinción inmunohistoquímica y un análisis FISH. Cinco pacientes fueron tratados con vemurafenib y tres con dabrafenib. Después de adquirir resistencia a una terapia dirigida, cinco pacientes presentaban NRAS de tipo salvaje y tres presentaban una mutación de NRAS heterocigótica (codón-61). En un paciente tratado con vemurafenib, el análisis inmunohistoquímico de la expresión de BPTF indicó que, aunque la expresión de BPTF era homogénea en un espécimen metastásico antes del tratamiento con el inhibidor de BRAF, en el espécimen tratado, la expresión de BPTF era heterogénea, con un clon de células sin expresión de BPTF (lo cual sugiere que las células responden al tratamiento) y otro clon de células con unos niveles elevados de expresión de BPTF (lo cual sugiere que las células son resistentes al tratamiento) (figura 5E-F). El análisis inmunohistoquímico empleando anticuerpos dirigidos a los antígenos de melanocitos MART1, HMB45 y tirosinasa reveló una tinción positiva de ambas regiones (figura 5G), lo cual confirma el linaje melanocítico de estas células. Una tinción TUNEL identificó que muchas de las células que expresan poco BPTF o no expresan BPTF habían sufrido apoptosis. Un análisis FISH reveló la heterogeneidad en el número de copias de BPTF en el espécimen tratado (figura 5H). Además, se produjo un aumento en el promedio de número de copias de BPTF (de $2,6 \pm 1,9$ a $3,5 \pm 2,5$) cuando se comparan los especímenes del pretratamiento y tratados. Se muestran descubrimientos similares en especímenes procedentes de un paciente tratado con vemurafenib (figura 13). En total, seis (75%) de los ocho tumores de postratamiento de los pacientes se caracterizaron por una heterogeneidad de la expresión de BPTF. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que unos niveles mayores de BPTF pueden mediar en la resistencia adquirida a inhibidores de BRAF selectivos en pacientes con melanoma, y pueden seleccionarse durante el desarrollo de la resistencia adquirida a estos agentes.

35 BPTF estimula el avance del glioblastoma. Se realizó un estudio para determinar si el BPTF estaba implicado en el avance de otros tumores sólidos. Puesto que los melanocitos surgen de la cresta neural embrionaria y puesto que la expresión de BPTF es abundante en el cerebro fetal humano (Bowser *et al.*, 1995), se realizaron experimentos dirigidos a determinar el papel funcional del BPTF en el avance del GBM, que también tiene un origen neuroectodérmico. La supresión estable de la expresión de BPTF por ARNhc 3 de BPTF (figura 6A) en células de GMB U251 humanas produjo una proliferación significativamente reducida, según se determinó mediante ensayos de supervivencia celular (figura 6B) y formación de colonias (figura 6C). La supresión de la expresión de BPTF condujo a una significativa detención del ciclo celular en G1/G0, con una supresión concomitante en la fase S (figura 6D, $p < 0,01$), y en la inducción de la apoptosis (figura 6E, $p < 0,02$). La supresión de BPTF también redujo significativamente la invasividad de las células U251 (figura 7C). La inactivación del BPTF dio como resultado la supresión de la expresión de BCL2, BCL-XL y CCND2 en células GBM (figura 6F-G), acompañada de una significativa supresión en ERK1/2 fosforilado y p90RSK (figura 6G). Los estudios *in vivo* demostraron una reducción muy significativa en el crecimiento de células tumorales U251 tras una inoculación subcutánea después de la

supresión de BPTF (figura 6H). Se observaron efectos similares tras la supresión de BPTF en células LN18 (figura 14). Así, estos resultados demuestran el papel funcional del BPTF en la estimulación del avance del glioblastoma mediante la activación de genes y vías similares a los identificados en células de melanoma.

- 5 Por último, se identificaron los subtipos moleculares de GBM en los que la expresión BPTF está enriquecida. El análisis del conjunto de datos de TCGA reveló que la sobreexpresión de BPTF se produce de modo más habitual en el subconjunto pro-neural de los GBM (Verhaak *et al.*, 2010). Para confirmar esta observación, se observaron los niveles de expresión de BPTF en una muestra independiente de 14 GBM que se clasificaron como pro-neurales o mesenquimáticos en virtud de la expresión de varios marcadores de clasificación establecidos (los marcadores mesenquimáticos CEBPB, CHI3L1 TWIST1, y los marcadores pro-neurales , DLL3, OLIG2 y PDGFRA). La expresión de BPTF (según se determina mediante un análisis de qRT-PCR) fue significativamente mayor en el subconjunto pro-neural frente al conjunto mesenquimático de los GBM (figura 6I).
- 10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SUTTER WEST BAY HOSPITALS
Kashani-Sabet, Mohammed
Dar, Altaf

5 <120> FALZ para su uso como diana para terapias para tratar el cáncer

<130> 00010-016WO1

10 <140> No asignada aún

<141> 15-03-2014

<150> US 61/790,153

15 <151> 15-03-2013

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 9700
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <220>
<221> CDS
<222> (472)..(8817)

30 <400> 1
agccgccact gcgtccggcc ctcccctgca gctttccctt ctcccgcgc ctgggctcca 60
acaagagggg ccggcggggc aggccgacca agcagccgc ggtcccgct gcggagcgt 120
gcgccccggc cccgcgcgc cgcgcgcca cgtccggacc catcggggc tcccctcgc 180
gatacgcggt agtagccggg gcaggtgggc agccgccag ctgaggtggc gcccagacg 240
cggctgagct cgcccagggt gggcagcagt agccggagga agccgcgcc gccgccgcc 300
gccccccca gcaccagcgc cccgggcccg gggggcgcg gaggcgggg cggcacgacg 360
gggggcgggg gcggcggcgg ccacctgtcc cggaccaccg cggcccggag ggccgtcaac 420
aaagtgggt acgatgacca cgagagcgc gcggtggag aagaggagga c atg gtc 477
Met Val
1
tcc gag gag gag gag gag gag gac ggc gac gcc gag gag acc cag gat 525
Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Asp Ala Glu Glu Thr Gln Asp
5 10 15
tct gag gac gac gag gag gat gag atg gaa gag gac gac gat gac tcc 573
Ser Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Met Glu Glu Asp Asp Asp Asp Ser
20 25 30
gat tat ccg gag gag atg gaa gac gac gac gac gac gcc agt tac tgc 621
Asp Tyr Pro Glu Glu Met Glu Asp Asp Asp Ala Ser Tyr Cys
35 40 45 50
acg gaa agc agc ttc agg agc cat agt acc tac agc agc act cca ggt 669

ES 2 672 989 T3

Thr	Glu	Ser	Ser	Phe	Arg	Ser	His	Ser	Thr	Tyr	Ser	Ser	Thr	Pro	Gly	
				55					60					65		
agg	cga	aaa	cca	aga	gta	cat	cgg	cct	cgt	tct	cct	ata	ttg	gaa	gaa	717
Arg	Arg	Lys	Pro	Arg	Val	His	Arg	Pro	Arg	Ser	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	
			70				75						80			
aaa	gac	atc	ccg	ccc	ctt	gaa	ttt	ccc	aag	tcc	tct	gag	gat	tta	atg	765
Lys	Asp	Ile	Pro	Pro	Leu	Glu	Phe	Pro	Lys	Ser	Ser	Glu	Asp	Leu	Met	
		85					90					95				
gtg	cct	aat	gag	cat	ata	atg	aat	gtc	att	gcc	att	tac	gag	gta	ctg	813
Val	Pro	Asn	Glu	His	Ile	Met	Asn	Val	Ile	Ala	Ile	Tyr	Glu	Val	Leu	
	100					105					110					
cgg	aac	ttt	ggc	act	gtt	ttg	aga	tta	tct	cct	ttt	cgc	ttt	gag	gac	861
Arg	Asn	Phe	Gly	Thr	Val	Leu	Arg	Leu	Ser	Pro	Phe	Arg	Phe	Glu	Asp	
	115				120					125				130		
ttt	tgt	gca	gct	ctg	gtg	agc	caa	gag	cag	tgc	aca	ctc	atg	gca	gag	909
Phe	Cys	Ala	Ala	Leu	Val	Ser	Gln	Glu	Gln	Cys	Thr	Leu	Met	Ala	Glu	
				135					140					145		
atg	cat	gtt	gtg	ctt	ttg	aaa	gca	gtt	ctg	cgt	gaa	gaa	gac	act	tcc	957
Met	His	Val	Val	Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Thr	Ser	
			150					155					160			
aat	act	acc	ttt	gga	cct	gct	gat	ctg	aaa	gat	agc	gtt	aat	tcc	aca	1005
Asn	Thr	Thr	Phe	Gly	Pro	Ala	Asp	Leu	Lys	Asp	Ser	Val	Asn	Ser	Thr	
			165				170					175				
ctg	tat	ttc	ata	gat	ggg	atg	acg	tgg	cca	gag	gtg	ctg	cgg	gtg	tac	1053
Leu	Tyr	Phe	Ile	Asp	Gly	Met	Thr	Trp	Pro	Glu	Val	Leu	Arg	Val	Tyr	
	180					185						190				
tgt	gag	agt	gat	aag	gag	tac	cat	cac	gtt	ctt	cct	tac	caa	gag	gca	1101
Cys	Glu	Ser	Asp	Lys	Glu	Tyr	His	His	Val	Leu	Pro	Tyr	Gln	Glu	Ala	
	195				200					205				210		
gag	gac	tac	cca	tat	gga	cca	gta	gag	aac	aag	atc	aaa	gtt	cta	cag	1149
Glu	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Gly	Pro	Val	Glu	Asn	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Gln	
			215						220				225			
ttt	cta	gtc	gat	cag	ttt	ctt	aca	aca	aat	att	gct	cga	gag	gaa	ttg	1197
Phe	Leu	Val	Asp	Gln	Phe	Leu	Thr	Thr	Asn	Ile	Ala	Arg	Glu	Glu	Leu	
			230						235				240			
atg	tct	gaa	ggg	gtg	ata	cag	tat	gat	gac	cat	tgt	agg	gtt	tgt	cac	1245
Met	Ser	Glu	Gly	Val	Ile	Gln	Tyr	Asp	Asp	His	Cys	Arg	Val	Cys	His	
		245					250					255				
aaa	ctt	ggg	gat	ttg	ctt	tgc	tgt	gag	aca	tgt	tca	gca	gta	tac	cat	1293
Lys	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	Cys	Cys	Glu	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Tyr	His	
	260					265					270					
ttg	gaa	tgt	gtg	aag	cca	cct	ctt	gag	gag	gtg	cca	gag	gac	gag	tgg	1341
Leu	Glu	Cys	Val	Lys	Pro	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Pro	Glu	Asp	Glu	Trp	
	275				280					285				290		
cag	tgt	gaa	gtc	tgt	gta	gca	cac	aag	gtg	cct	ggt	gtg	act	gac	tgt	1389
Gln	Cys	Glu	Val	Cys	Val	Ala	His	Lys	Val	Pro	Gly	Val	Thr	Asp	Cys	

ES 2 672 989 T3

	295	300	305	
ggt gct gaa atc caa aaa aat aaa cca tat att cga cat gaa cct att				1437
Val Ala Glu Ile Gln Lys Asn Lys Pro Tyr Ile Arg His Glu Pro Ile	310	315	320	
gga tat gat aga agt cgg agg aaa tac tgg ttc ttg aac cga aga ctc				1485
Gly Tyr Asp Arg Ser Arg Arg Lys Tyr Trp Phe Leu Asn Arg Arg Leu	325	330	335	
ata ata gaa gaa gat aca gaa aat gaa aat gaa aag aaa att tgg tat				1533
Ile Ile Glu Glu Asp Thr Glu Asn Glu Asn Glu Lys Lys Ile Trp Tyr	340	345	350	
tac agc aca aag gtc caa ctt gca gaa tta att gac tgt cta gac aaa				1581
Tyr Ser Thr Lys Val Gln Leu Ala Glu Leu Ile Asp Cys Leu Asp Lys	355	360	365	370
gat tat tgg gaa gca gaa ctc tgc aaa att cta gaa gaa atg cgt gaa				1629
Asp Tyr Trp Glu Ala Glu Leu Cys Lys Ile Leu Glu Glu Met Arg Glu	375	380	385	
gaa atc cac cga cac atg gac ata act gaa gac ctg acc aat aag gct				1677
Glu Ile His Arg His Met Asp Ile Thr Glu Asp Leu Thr Asn Lys Ala	390	395	400	
cgg ggc agt aac aaa tcc ttt ctg gcg gca gct aat gaa gaa att ttg				1725
Arg Gly Ser Asn Lys Ser Phe Leu Ala Ala Ala Asn Glu Glu Ile Leu	405	410	415	
gag tcc ata aga gcc aaa aag gga gac att gat aat gtt aaa agc cca				1773
Glu Ser Ile Arg Ala Lys Lys Gly Asp Ile Asp Asn Val Lys Ser Pro	420	425	430	
gaa gaa aca gaa aaa gac aag aat gag act gag aat gac tct aaa gat				1821
Glu Glu Thr Glu Lys Asp Lys Asn Glu Thr Glu Asn Asp Ser Lys Asp	435	440	445	450
gct gag aaa aac aga gaa gaa ttt gaa gac cag tcc ctt gaa aaa gac				1869
Ala Glu Lys Asn Arg Glu Glu Phe Glu Asp Gln Ser Leu Glu Lys Asp	455	460	465	
agt gac gac aaa aca cca gat gat gac cct gag caa gga aaa tct gag				1917
Ser Asp Asp Lys Thr Pro Asp Asp Asp Pro Glu Gln Gly Lys Ser Glu	470	475	480	
gta ggt gat ttc aaa tcg gag aag tcc aac ggg gag cta agt gaa tct				1965
Val Gly Asp Phe Lys Ser Glu Lys Ser Asn Gly Glu Leu Ser Glu Ser	485	490	495	
cct gga gct gga aaa gga gca tct ggc tca act cga atc atc acc aga				2013
Pro Gly Ala Gly Lys Gly Ala Ser Gly Ser Thr Arg Ile Ile Thr Arg	500	505	510	
ttg cgg aat cca gat agc aaa ctt agt cag ctg aag agc cag cag gtg				2061
Leu Arg Asn Pro Asp Ser Lys Leu Ser Gln Leu Lys Ser Gln Gln Val	515	520	525	530
gca gcc gct gca cat gaa gca aat aaa tta ttt aag gag ggc aaa gag				2109
Ala Ala Ala Ala His Glu Ala Asn Lys Leu Phe Lys Glu Gly Lys Glu	535	540	545	

ES 2 672 989 T3

gta ctg gta gtt aac tct caa gga gaa att tca cgg ttg agc acc aaa 2157
Val Leu Val Val Asn Ser Gln Gly Glu Ile Ser Arg Leu Ser Thr Lys
550 555 560

aag gaa gtg atc atg aaa gga aat atc aac aat tat ttt aaa ttg ggt 2205
Lys Glu Val Ile Met Lys Gly Asn Ile Asn Asn Tyr Phe Lys Leu Gly
565 570 575

caa gaa ggg aag tat cgc gtc tac cac aat caa tac tcc acc aat tca 2253
Gln Glu Gly Lys Tyr Arg Val Tyr His Asn Gln Tyr Ser Thr Asn Ser
580 585 590

ttt gct ttg aat aag cac cag cac aga gaa gac cat gat aag aga agg 2301
Phe Ala Leu Asn Lys His Gln His Arg Glu Asp His Asp Lys Arg Arg
595 600 605 610

cat ctt gca cat aag ttc tgt ctg act cca gca gga gag ttc aaa tgg 2349
His Leu Ala His Lys Phe Cys Leu Thr Pro Ala Gly Glu Phe Lys Trp
615 620 625

aac ggt tct gtc cat ggg tcc aaa gtt ctt acc ata tct act ctg aga 2397
Asn Gly Ser Val His Gly Ser Lys Val Leu Thr Ile Ser Thr Leu Arg
630 635 640

ctg act atc acc caa tta gaa aac aac atc cct tca tcc ttt ctt cat 2445
Leu Thr Ile Thr Gln Leu Glu Asn Asn Ile Pro Ser Ser Phe Leu His
645 650 655

ccc aac tgg gca tca cat agg gca aat tgg atc aag gca gtt cag atg 2493
Pro Asn Trp Ala Ser His Arg Ala Asn Trp Ile Lys Ala Val Gln Met
660 665 670

tgt agc aaa ccc aga gaa ttt gca ttg gct tta gcc att ttg gag tgt 2541
Cys Ser Lys Pro Arg Phe Ala Leu Ala Ile Leu Glu Cys
675 680 685 690

gca gtt aaa cca gtt gtg atg cta cca ata tgg cga gaa ttt tta gga 2589
Ala Val Lys Pro Val Val Met Leu Pro Ile Trp Arg Glu Phe Leu Gly
695 700 705

cat acc agg tta cac cgg atg aca tca att gaa aga gaa gaa aag gag 2637
His Thr Arg Leu His Arg Met Thr Ser Ile Glu Arg Glu Glu Lys Glu
710 715 720

aaa gtc aaa aaa gag aag aaa cag gaa gaa gaa gaa acg atg cag 2685
Lys Val Lys Lys Lys Glu Lys Lys Gln Glu Glu Glu Thr Met Gln
725 730 735

caa gcg aca tgg gta aaa tac aca ttt cca gtt aag cat cag gtt tgg 2733
Gln Ala Thr Trp Val Lys Tyr Thr Phe Pro Val Lys His Gln Val Trp
740 745 750

aaa caa aaa ggt gaa gag tac aga gtg aca gga tat ggt ggt tgg agc 2781
Lys Gln Lys Gly Glu Glu Tyr Arg Val Thr Gly Tyr Gly Gly Trp Ser
755 760 765 770

tgg att agt aaa act cat gtt tat agg ttt gtt cct aaa ttg cca ggc 2829
Trp Ile Ser Lys Thr His Val Tyr Arg Phe Val Pro Lys Leu Pro Gly
775 780 785

ES 2 672 989 T3

aat act aat gtg aat tac aga aag tcg tta gaa gga acc aaa aat aat Asn Thr Asn Val Asn Tyr Arg Lys Ser Leu Glu Gly Thr Lys Asn Asn 790 795 800	2877
atg gat gaa aat atg gat gag tca gat aaa aga aaa tgt tca cga agt Met Asp Glu Asn Met Asp Glu Ser Asp Lys Arg Lys Cys Ser Arg Ser 805 810 815	2925
cca aaa aaa ata aaa ata gag cct gat tct gaa aaa gat gag gta aaa Pro Lys Lys Ile Lys Ile Glu Pro Asp Ser Glu Lys Asp Glu Val Lys 820 825 830	2973
ggt tca gat gct gca aaa gga gca gac caa aat gaa atg gat atc tca Gly Ser Asp Ala Ala Lys Gly Ala Asp Gln Asn Glu Met Asp Ile Ser 835 840 845 850	3021
aag att act gag aag aag gac caa gat gtg aag gag ctc tta gat tct Lys Ile Thr Glu Lys Lys Asp Gln Asp Val Lys Glu Leu Leu Asp Ser 855 860 865	3069
gac agt gat aaa ccc tgc aag gaa gaa cca atg gaa gta gac gat gac Asp Ser Asp Lys Pro Cys Lys Glu Glu Pro Met Glu Val Asp Asp Asp 870 875 880	3117
atg aaa aca gag tca cat gta aat tgt cag gag agt tct caa gta gat Met Lys Thr Glu Ser His Val Asn Cys Gln Glu Ser Ser Gln Val Asp 885 890 895	3165
gtg gtc aat gtt agt gag ggt ttt cat cta agg act agt tac aaa aag Val Val Asn Val Ser Glu Gly Phe His Leu Arg Thr Ser Tyr Lys Lys 900 905 910	3213
aaa aca aaa tca tcc aaa cta gat gga ctt ctt gaa agg aga att aaa Lys Thr Lys Ser Ser Lys Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Arg Ile Lys 915 920 925 930	3261
cag ttt aca ctg gaa gaa aaa cag cga ctc gaa aaa atc aag ttg gag Gln Phe Thr Leu Glu Glu Lys Gln Arg Leu Glu Lys Ile Lys Leu Glu 935 940 945	3309
ggt gga att aag ggt ata gga aag act tct aca aat tct tca aaa aat Gly Gly Ile Lys Gly Ile Gly Lys Thr Ser Thr Asn Ser Ser Lys Asn 950 955 960	3357
ctc tct gaa tca cca gta ata acg aaa gca aaa gaa ggg tgt cag agt Leu Ser Glu Ser Pro Val Ile Thr Lys Ala Lys Glu Gly Cys Gln Ser 965 970 975	3405
gac tcg atg aga caa gaa cag agc cca aat gca aat aat gat caa cct Asp Ser Met Arg Gln Glu Gln Ser Pro Asn Ala Asn Asn Asp Gln Pro 980 985 990	3453
gag gac ttg att cag gga tgt tca caa agt gat tcc tca gtt ctt Glu Asp Leu Ile Gln Gly Cys Ser Gln Ser Asp Ser Ser Val Leu 995 1000 1005	3498
aga atg agt gat cct agt cat acc aca aac aaa ctt tat cca aaa Arg Met Ser Asp Pro Ser His Thr Thr Asn Lys Leu Tyr Pro Lys 1010 1015 1020	3543
gat cga gtg tta gat gat gtc tcc att cgg agc cca gaa aca aaa	3588

ES 2 672 989 T3

Asp 1025	Arg	Val	Leu	Asp	Asp 1030	Val	Ser	Ile	Arg	Ser 1035	Pro	Glu	Thr	Lys	
tgt	ccg	aaa	caa	aat	tcc	att	gaa	aat	gac	ata	gaa	gaa	aaa	gtc	3633
Cys 1040	Pro	Lys	Gln	Asn	Ser 1045	Ile	Glu	Asn	Asp	Ile 1050	Glu	Glu	Lys	Val	
tct	gac	ctt	gcc	agt	aga	ggc	cag	gaa	ccc	act	aag	agt	aaa	acc	3678
Ser 1055	Asp	Leu	Ala	Ser	Arg 1060	Gly	Gln	Glu	Pro	Thr 1065	Lys	Ser	Lys	Thr	
aaa	gga	aat	gat	ttt	ttc	atc	gat	gac	tct	aaa	cta	gcc	agt	gca	3723
Lys 1070	Gly	Asn	Asp	Phe	Phe 1075	Ile	Asp	Asp	Ser	Lys 1080	Leu	Ala	Ser	Ala	
gat	gat	att	ggt	act	ttg	atc	tgt	aag	aac	aaa	aaa	ccg	ctc	ata	3768
Asp 1085	Asp	Ile	Gly	Thr	Leu 1090	Ile	Cys	Lys	Asn	Lys 1095	Lys	Pro	Leu	Ile	
cag	gag	gaa	agt	gac	acc	att	ggt	tct	tct	tcc	aag	agt	gct	tta	3813
Gln 1100	Glu	Glu	Ser	Asp	Thr 1105	Ile	Val	Ser	Ser	Ser 1110	Lys	Ser	Ala	Leu	
cat	tca	tca	gtg	cct	aaa	agt	acc	aat	gac	aga	gat	gcc	aca	cct	3858
His 1115	Ser	Ser	Val	Pro	Lys 1120	Ser	Thr	Asn	Asp	Arg 1125	Asp	Ala	Thr	Pro	
ctg	tca	aga	gca	atg	gac	ttt	gaa	gga	aaa	ctg	gga	tgt	gac	tct	3903
Leu 1130	Ser	Arg	Ala	Met	Asp 1135	Phe	Glu	Gly	Lys	Leu 1140	Gly	Cys	Asp	Ser	
gaa	tct	aat	agc	act	ttg	gaa	aat	agt	tct	gat	acc	gtg	tct	att	3948
Glu 1145	Ser	Asn	Ser	Thr	Leu 1150	Glu	Asn	Ser	Ser	Asp 1155	Thr	Val	Ser	Ile	
cag	gat	agc	agt	gaa	gaa	gat	atg	att	ggt	cag	aat	agc	aat	gaa	3993
Gln 1160	Asp	Ser	Ser	Glu	Glu 1165	Asp	Met	Ile	Val	Gln 1170	Asn	Ser	Asn	Glu	
agc	att	tct	gaa	cag	ttc	aga	act	cga	gaa	caa	gat	ggt	gaa	gtc	4038
Ser 1175	Ile	Ser	Glu	Gln	Phe 1180	Arg	Thr	Arg	Glu	Gln 1185	Asp	Val	Glu	Val	
ttg	gag	ccg	tta	aag	tgt	gag	ttg	ggt	tct	ggt	gag	tcc	act	gga	4083
Leu 1190	Glu	Pro	Leu	Lys	Cys 1195	Glu	Leu	Val	Ser	Gly 1200	Glu	Ser	Thr	Gly	
aac	tgt	gag	gac	agg	ctg	ccg	gtc	aag	ggg	act	gaa	gca	aat	ggt	4128
Asn 1205	Cys	Glu	Asp	Arg	Leu 1210	Pro	Val	Lys	Gly	Thr 1215	Glu	Ala	Asn	Gly	
aaa	aaa	cca	agt	cag	cag	aag	aaa	tta	gag	gag	aga	cca	ggt	aat	4173
Lys 1220	Lys	Pro	Ser	Gln	Gln 1225	Lys	Lys	Leu	Glu	Glu 1230	Arg	Pro	Val	Asn	
aaa	tgt	agt	gat	caa	ata	aag	cta	aaa	aat	acc	act	gac	aaa	aag	4218
Lys 1235	Cys	Ser	Asp	Gln	Ile 1240	Lys	Leu	Lys	Asn	Thr 1245	Thr	Asp	Lys	Lys	
aat	aat	gaa	aat	cga	gag	tct	gaa	aag	aaa	gga	cag	aga	aca	agt	4263
Asn	Asn	Glu	Asn	Arg	Glu	Ser	Glu	Lys	Lys	Gly	Gln	Arg	Thr	Ser	

ES 2 672 989 T3

1250	1255	1260	
aca ttt caa ata aat gga	aaa gat aat aaa ccc	aaa ata tat ttg	4308
Thr Phe Gln Ile Asn Gly	Lys Asp Asn Lys Pro	Lys Ile Tyr Leu	
1265	1270	1275	
aaa ggt gaa tgc ttg	aaa gaa att tct gag agt	aga gta gta agt	4353
Lys Gly Glu Cys Leu Lys	Glu Ile Ser Glu Ser	Arg Val Val Ser	
1280	1285	1290	
ggt aat gtt gaa cca aag	gtt aat aat ata aat	aaa ata atc cct	4398
Gly Asn Val Glu Pro Lys	Val Asn Asn Ile Asn	Lys Ile Ile Pro	
1295	1300	1305	
gag aat gat att aaa tca	ttg act gtt aaa gaa	tct gct ata agg	4443
Glu Asn Asp Ile Lys Ser	Leu Thr Val Lys Glu	Ser Ala Ile Arg	
1310	1315	1320	
cca ttc att aat ggt gat	gtc atc atg gaa gat	ttt aat gaa aga	4488
Pro Phe Ile Asn Gly Asp	Val Ile Met Glu Asp	Phe Asn Glu Arg	
1325	1330	1335	
aac agc tcc gaa aca aaa	tcg cat ttg ctg agt	tct tca gat gct	4533
Asn Ser Ser Glu Thr Lys	Ser His Leu Leu Ser	Ser Ser Asp Ala	
1340	1345	1350	
gaa ggt aac tac cga gat	agc ctt gag acc ctg	cca tca acc aaa	4578
Glu Gly Asn Tyr Arg Asp	Ser Leu Glu Thr Leu	Pro Ser Thr Lys	
1355	1360	1365	
gag tct gac agt aca cag	acg acc aca ccc tca	gca tct tgt cca	4623
Glu Ser Asp Ser Thr Gln	Thr Thr Thr Pro Ser	Ala Ser Cys Pro	
1370	1375	1380	
gaa agc aat tca gtt aat	cag gta gaa gat atg	gaa ata gaa acc	4668
Glu Ser Asn Ser Val Asn	Gln Val Glu Asp Met	Glu Ile Glu Thr	
1385	1390	1395	
tca gaa gtt aag aaa gtt	act tca tca cct att	act tct gaa gag	4713
Ser Glu Val Lys Lys Val	Thr Ser Ser Pro Ile	Thr Ser Glu Glu	
1400	1405	1410	
gaa tct aat ctc agt aat	gac ttt att gat gaa	aat ggt ctg ccc	4758
Glu Ser Asn Leu Ser Asn	Asp Phe Ile Asp Glu	Asn Gly Leu Pro	
1415	1420	1425	
atc aac aaa aat gaa aat	gtc aat gga gaa tct	aaa aga aaa acc	4803
Ile Asn Lys Asn Glu Asn	Val Asn Gly Glu Ser	Lys Arg Lys Thr	
1430	1435	1440	
gtc atc aca gaa gtc acc	acg atg acc tcc aca	gtg gcc aca gaa	4848
Val Ile Thr Glu Val Thr	Thr Met Thr Ser Thr	Val Ala Thr Glu	
1445	1450	1455	
tca aaa act gtg atc aag	gta gaa aaa ggc gat	aag caa act gtg	4893
Ser Lys Thr Val Ile Lys	Val Glu Lys Gly Asp	Lys Gln Thr Val	
1460	1465	1470	
ggt tct tcc aca gaa aat	tgt gca aaa tcc act	gtc aca acc acc	4938
Val Ser Ser Thr Glu Asn	Cys Ala Lys Ser Thr	Val Thr Thr Thr	
1475	1480	1485	

ES 2 672 989 T3

act	aca	aca	gtg	acc	aag	ctt	tcc	aca	ccc	tcc	aca	ggc	ggc	agt	4983
Thr	Thr	Thr	Val	Thr	Lys	Leu	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Ser	
1490					1495					1500					
gtg	gac	atc	atc	tct	gta	aag	gag	cag	agc	aaa	acc	gtg	gtc	acc	5028
Val	Asp	Ile	Ile	Ser	Val	Lys	Glu	Gln	Ser	Lys	Thr	Val	Val	Thr	
1505					1510					1515					
acg	aca	gtg	aca	gac	tcc	ctg	acc	acc	acg	gga	ggc	aca	ctg	gtt	5073
Thr	Thr	Val	Thr	Asp	Ser	Leu	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Val	
1520					1525					1530					
aca	tct	atg	act	gtg	agc	aaa	gag	tat	tcc	aca	cga	gac	aaa	gtg	5118
Thr	Ser	Met	Thr	Val	Ser	Lys	Glu	Tyr	Ser	Thr	Arg	Asp	Lys	Val	
1535					1540					1545					
aaa	ctg	atg	aaa	ttt	tca	aga	cca	aag	aag	act	cgt	tca	ggt	aca	5163
Lys	Leu	Met	Lys	Phe	Ser	Arg	Pro	Lys	Lys	Thr	Arg	Ser	Gly	Thr	
1550					1555					1560					
gct	ctg	cca	tcc	tat	aga	aaa	ttt	gtt	acc	aag	agc	acc	aag	aag	5208
Ala	Leu	Pro	Ser	Tyr	Arg	Lys	Phe	Val	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Lys	
1565					1570					1575					
agc	att	ttt	gtt	ttg	cct	aat	gat	gac	tta	aaa	aag	ttg	gcc	cga	5253
Ser	Ile	Phe	Val	Leu	Pro	Asn	Asp	Asp	Leu	Lys	Lys	Leu	Ala	Arg	
1580					1585					1590					
aaa	gga	gga	atc	cga	gag	gtc	cct	tat	ttt	aat	tac	aat	gca	aaa	5298
Lys	Gly	Gly	Ile	Arg	Glu	Val	Pro	Tyr	Phe	Asn	Tyr	Asn	Ala	Lys	
1595					1600					1605					
cct	gct	ttg	gat	ata	tgg	cca	tat	cct	tct	cct	aga	ccg	acc	ttt	5343
Pro	Ala	Leu	Asp	Ile	Trp	Pro	Tyr	Pro	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	
1610					1615					1620					
ggc	atc	act	tgg	agg	tat	aga	ctt	cag	aca	gta	aag	tcc	tta	gct	5388
Gly	Ile	Thr	Trp	Arg	Tyr	Arg	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Ser	Leu	Ala	
1625					1630					1635					
gga	gtg	agc	ctg	atg	tta	cgg	tta	ctg	tgg	gca	agt	ttg	aga	tgg	5433
Gly	Val	Ser	Leu	Met	Leu	Arg	Leu	Leu	Trp	Ala	Ser	Leu	Arg	Trp	
1640					1645					1650					
gat	gat	atg	gcg	gcc	aag	gtt	cct	cca	gga	gga	ggg	agt	aca	cgg	5478
Asp	Asp	Met	Ala	Ala	Lys	Val	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	
1655					1660					1665					
aca	gaa	aca	tcc	gaa	act	gaa	atc	aca	aca	aca	gaa	ata	att	aag	5523
Thr	Glu	Thr	Ser	Glu	Thr	Glu	Ile	Thr	Thr	Thr	Glu	Ile	Ile	Lys	
1670					1675					1680					
agg	aga	gat	gtt	ggt	cct	tat	ggc	att	cga	ttt	gaa	tat	tgt	atc	5568
Arg	Arg	Asp	Val	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ile	Arg	Phe	Glu	Tyr	Cys	Ile	
1685					1690					1695					
agg	aaa	atc	att	tgt	ccc	att	gga	gtt	cca	gaa	aca	cca	aaa	gaa	5613
Arg	Lys	Ile	Ile	Cys	Pro	Ile	Gly	Val	Pro	Glu	Thr	Pro	Lys	Glu	
1700					1705					1710					

ES 2 672 989 T3

acg	cct	aca	cct	cag	agg	aaa	ggc	ctt	cga	tca	agt	gca	ctg	cgg	5658
Thr	Pro	Thr	Pro	Gln	Arg	Lys	Gly	Leu	Arg	Ser	Ser	Ala	Leu	Arg	
1715					1720					1725					
cca	aag	aga	cca	gaa	acg	ccc	aag	caa	act	ggc	cct	gtt	att	att	5703
Pro	Lys	Arg	Pro	Glu	Thr	Pro	Lys	Gln	Thr	Gly	Pro	Val	Ile	Ile	
1730					1735					1740					
gaa	acc	tgg	gta	gca	gaa	gaa	gaa	ctg	gaa	ttg	tgg	gag	atc	agg	5748
Glu	Thr	Trp	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu	Trp	Glu	Ile	Arg	
1745					1750					1755					
gca	ttt	gct	gag	aga	gtg	gag	aaa	gaa	aag	gca	caa	gca	gtt	gag	5793
Ala	Phe	Ala	Glu	Arg	Val	Glu	Lys	Glu	Lys	Ala	Gln	Ala	Val	Glu	
1760					1765					1770					
caa	cag	gct	aag	aaa	cga	ctg	gag	cag	cag	aag	ccg	aca	gtg	att	5838
Gln	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln	Gln	Lys	Pro	Thr	Val	Ile	
1775					1780					1785					
gca	act	tcc	act	act	tcc	cca	aca	agc	agt	aca	acc	agc	acc	atc	5883
Ala	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Pro	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ile	
1790					1795					1800					
tct	cca	gca	cag	aaa	gtt	atg	gtg	gcc	ccc	ata	agt	ggc	tca	gtt	5928
Ser	Pro	Ala	Gln	Lys	Val	Met	Val	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	
1805					1810					1815					
aca	act	gga	acc	aaa	atg	gta	cta	act	act	aaa	gtt	gga	tct	cca	5973
Thr	Thr	Gly	Thr	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Thr	Lys	Val	Gly	Ser	Pro	
1820					1825					1830					
gct	aca	gta	aca	ttc	caa	caa	aac	aag	aac	ttt	cat	caa	acc	ttt	6018
Ala	Thr	Val	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Lys	Asn	Phe	His	Gln	Thr	Phe	
1835					1840					1845					
gct	aca	tgg	gtt	aag	caa	ggc	cag	tca	aat	tca	ggc	gtt	gtt	caa	6063
Ala	Thr	Trp	Val	Lys	Gln	Gly	Gln	Ser	Asn	Ser	Gly	Val	Val	Gln	
1850					1855					1860					
gta	cag	cag	aaa	gtc	ctg	ggt	atc	att	cca	tca	agt	aca	ggt	acc	6108
Val	Gln	Gln	Lys	Val	Leu	Gly	Ile	Ile	Pro	Ser	Ser	Thr	Gly	Thr	
1865					1870					1875					
agt	cag	caa	acc	ttt	act	tca	ttc	cag	ccc	agg	aca	gca	aca	gtc	6153
Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Thr	Ser	Phe	Gln	Pro	Arg	Thr	Ala	Thr	Val	
1880					1885					1890					
aca	att	agg	ccc	aat	acc	tca	ggc	tct	gga	gga	acc	aca	agc	aat	6198
Thr	Ile	Arg	Pro	Asn	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Ser	Asn	
1895					1900					1905					
tca	caa	gta	atc	aca	ggg	cct	cag	att	cgc	cct	ggt	atg	acc	gtg	6243
Ser	Gln	Val	Ile	Thr	Gly	Pro	Gln	Ile	Arg	Pro	Gly	Met	Thr	Val	
1910					1915					1920					
att	aga	aca	cca	ctc	caa	cag	tca	aca	cta	gga	aag	gca	att	att	6288
Ile	Arg	Thr	Pro	Leu	Gln	Gln	Ser	Thr	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Ile	
1925					1930					1935					
cga	aca	cct	gtg	atg	gta	cag	cca	ggt	gct	cct	cag	caa	gtg	atg	6333

ES 2 672 989 T3

Arg 1940	Thr	Pro	Val	Met	Val 1945	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro 1950	Gln	Gln	Val	Met	
act Thr 1955	caa Gln	atc Ile	atc Ile	agg Arg	ggg Gly 1960	cag Gln	cct Pro	gtc Val	tcc Ser	act Thr 1965	gca Ala	gtc Val	tcc Ser	gcc Ala	6378
cct Pro 1970	aac Asn	acg Thr	gtt Val	tcc Ser	tca Ser 1975	aca Thr	cct Pro	ggg Gly	cag Gln	aaa Lys 1980	agc Ser	tta Leu	act Thr	tca Ser	6423
gca Ala 1985	acg Thr	tcc Ser	act Thr	tca Ser	aat Asn 1990	ata Ile	cag Gln	tct Ser	tca Ser	gcc Ala 1995	tca Ser	caa Gln	ccc Pro	cct Pro	6468
cgc Arg 2000	ccc Pro	caa Gln	caa Gln	gga Gly	caa Gln 2005	gtg Val	aag Lys	ctc Leu	acc Thr	atg Met 2010	gct Ala	caa Gln	ctt Leu	act Thr	6513
cag Gln 2015	tta Leu	aca Thr	cag Gln	ggc Gly	cac His 2020	ggg Gly	ggc Gly	aat Asn	caa Gln	ggg Gln 2025	ttg Leu	aca Thr	gta Val	gta Val	6558
att Ile 2030	caa Gln	gga Gly	caa Gln	ggg Gly	caa Gln 2035	act Thr	act Thr	gga Gly	cag Gln	ttg Leu 2040	cag Gln	ttg Leu	ata Ile	cct Pro	6603
caa Gln 2045	ggg Gly	gtg Val	act Thr	gta Val	ctc Leu 2050	cca Pro	ggc Gly	cca Pro	ggc Gly	cag Gln 2055	cag Gln	cta Leu	atg Met	caa Gln	6648
gct Ala 2060	gca Ala	atg Met	cca Pro	aat Asn	ggg Gly 2065	act Thr	gtt Val	cag Gln	cga Arg	ttc Phe 2070	ctc Leu	ttt Phe	acc Thr	cca Pro	6693
ttg Leu 2075	gca Ala	aca Thr	aca Thr	gcc Ala	acc Thr 2080	aca Thr	gcc Ala	agc Ser	acc Thr	acc Thr 2085	acc Thr	acc Thr	act Thr	gtt Val	6738
tcc Ser 2090	acg Thr	aca Thr	gca Ala	gca Ala	ggg Gly 2095	aca Thr	ggg Gly	gaa Glu	caa Gln	agg Arg 2100	cag Gln	agt Ser	aaa Lys	ctg Leu	6783
tca Ser 2105	ccc Pro	cag Gln	atg Met	cag Gln	gta Val 2110	cat His	caa Gln	gac Asp	aaa Lys	acc Thr 2115	ctg Leu	cca Pro	cca Pro	gct Ala	6828
cag Gln 2120	tca Ser	tca Ser	agt Ser	gtg Val	ggg Gly 2125	cca Pro	gca Ala	aaa Lys	gcc Ala	cag Gln 2130	cca Pro	cag Gln	act Thr	gct Ala	6873
cag Gln 2135	cct Pro	tca Ser	gct Ala	cgg Arg	ccc Pro 2140	cag Gln	ccc Pro	caa Gln	acc Thr	cag Gln 2145	ccc Pro	cag Gln	tcc Ser	cca Pro	6918
gct Ala 2150	cag Gln	cct Pro	gaa Glu	gtt Val	cag Gln 2155	act Thr	cag Gln	cct Pro	gaa Glu	gtt Val 2160	cag Gln	acc Thr	caa Gln	aca Thr	6963
act Thr	gtt Val	tca Ser	tcc Ser	cat His	gtc Val	cct Pro	tct Ser	gaa Glu	gca Ala	caa Gln	ccc Pro	acc Thr	cac His	gca Ala	7008

ES 2 672 989 T3

2165	2170	2175	
cag tca tcc aag ccc Gln Ser Ser Lys Pro 2180	caa gtt gca gca cag tct Gln Val Ala Ala Gln Ser 2185	cag cct caa agt Gln Pro Gln Ser 2190	7053
aat gtc caa gga cag Asn Val Gln Gly Gln 2195	tct cct gtt cgt gtc Ser Pro Val Arg Val 2200	caa agt cca tca cag Gln Ser Pro Ser Gln 2205	7098
act cga ata cgt cca Thr Arg Ile Arg Pro 2210	tca act cca tcc caa Ser Thr Pro Ser Gln 2215	ctg tct cct gga caa Leu Ser Pro Gly Gln 2220	7143
caa tcc cag gtt cag Gln Ser Gln Val Gln 2225	act aca acc tca caa Thr Thr Thr Ser Gln 2230	ccg att cca att caa Pro Ile Pro Ile Gln 2235	7188
cca cat aca tct ctt Pro His Thr Ser Leu 2240	cag ata cct tcc caa Gln Ile Pro Ser Gln 2245	ggc cag cca cag tca Gly Gln Pro Gln Ser 2250	7233
caa ccc cag gta cag Gln Pro Gln Val Gln 2255	tct tca act caa act Ser Ser Thr Gln Thr 2260	ctt tca tca gga caa Leu Ser Ser Gly Gln 2265	7278
act tta aat caa gtt Thr Leu Asn Gln Val 2270	agt gtt tca tcc cca Ser Val Ser Ser Pro 2275	tcc cgt cct cag cta Ser Arg Pro Gln Leu 2280	7323
caa ata cag cag cca Gln Ile Gln Gln Pro 2285	cag ccc caa gtc att Gln Pro Gln Val Ile 2290	gct gtg cct cag ctg Ala Val Pro Gln Leu 2295	7368
caa caa caa gtc cag Gln Gln Gln Val Gln 2300	gtt ctc tct cag atc Val Leu Ser Gln Ile 2305	cag tca cag gtt gtg Gln Ser Gln Val Val 2310	7413
gct cag ata cag gct Ala Gln Ile Gln Ala 2315	cag caa agt ggt gtg Gln Gln Ser Gly Val 2320	ccc cag caa atc aaa Pro Gln Gln Ile Lys 2325	7458
ctc cag tta cct atc Leu Gln Leu Pro Ile 2330	caa att cag caa agc Gln Ile Gln Gln Ser 2335	agt gct gtg cag act Ser Ser Ala Val Gln Thr 2340	7503
cac cag att cag aat His Gln Ile Gln Asn 2345	gtg gtt aca gtg cag Val Val Thr Val Gln 2350	gca gcc agt gtg caa Ala Ala Ser Val Gln 2355	7548
gag cag ttg caa agg Glu Gln Leu Gln Arg 2360	gtt cag caa ctc agg Val Gln Gln Leu Arg 2365	gat cag cag caa aag Asp Gln Gln Gln Lys 2370	7593
aag aaa cag caa cag Lys Lys Gln Gln Gln 2375	ata gaa att aag cgt Ile Glu Ile Lys Arg 2380	gaa cac acc ctc caa Glu His Thr Leu Gln 2385	7638
gct tct aat caa agt Ala Ser Asn Gln Ser 2390	gaa atc att cag aaa Glu Ile Ile Gln Lys 2395	cag gtg gtg atg aag Gln Val Val Met Lys 2400	7683

ES 2 672 989 T3

cat	aat	gct	gta	ata	gaa	cat	tta	aaa	cag	aaa	aag	agc	atg	act	7728
His	Asn	Ala	Val	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Gln	Lys	Lys	Ser	Met	Thr	
2405					2410					2415					
cca	gct	gaa	aga	gaa	gag	aat	caa	aga	atg	att	gtc	tgt	aac	cag	7773
Pro	Ala	Glu	Arg	Glu	Glu	Asn	Gln	Arg	Met	Ile	Val	Cys	Asn	Gln	
2420					2425					2430					
gtg	atg	aag	tat	att	ttg	gat	aag	ata	gat	aaa	gaa	gaa	aaa	cag	7818
Val	Met	Lys	Tyr	Ile	Leu	Asp	Lys	Ile	Asp	Lys	Glu	Glu	Lys	Gln	
2435					2440					2445					
gca	gca	aaa	aaa	cgg	aag	cgt	gaa	gag	agt	gtg	gag	cag	aaa	cgt	7863
Ala	Ala	Lys	Lys	Arg	Lys	Arg	Glu	Glu	Ser	Val	Glu	Gln	Lys	Arg	
2450					2455					2460					
agc	aag	cag	aat	gcc	act	aag	ctg	tca	gct	ctg	ctc	ttc	aag	cac	7908
Ser	Lys	Gln	Asn	Ala	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Phe	Lys	His	
2465					2470					2475					
aaa	gag	cag	ctc	aga	gcc	gag	atc	ctg	aag	aag	aga	gca	ctc	ctg	7953
Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Arg	Ala	Leu	Leu	
2480					2485					2490					
gac	aag	gat	ctg	caa	att	gaa	gtg	cag	gaa	gag	ctg	aag	aga	gac	7998
Asp	Lys	Asp	Leu	Gln	Ile	Glu	Val	Gln	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Asp	
2495					2500					2505					
ctg	aaa	att	aag	aaa	gaa	aaa	gac	ctg	atg	cag	ttg	gct	cag	gcc	8043
Leu	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Lys	Asp	Leu	Met	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	
2510					2515					2520					
aca	gca	gta	gct	gca	ccc	tgc	ccc	cca	gtg	aca	cca	gtt	ctt	cca	8088
Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Cys	Pro	Pro	Val	Thr	Pro	Val	Leu	Pro	
2525					2530					2535					
gcc	cct	cca	gcc	cct	cca	cct	tca	cct	ccc	cct	cca	cct	ggt	gtg	8133
Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Val	
2540					2545					2550					
caa	cac	aca	ggc	ctt	ctg	tcc	acg	ccc	acc	tta	cct	gtt	gct	tcc	8178
Gln	His	Thr	Gly	Leu	Leu	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Pro	Val	Ala	Ser	
2555					2560					2565					
cag	aag	agg	aag	cgg	gaa	gag	gaa	aaa	gac	tcc	agc	tca	aag	tcc	8223
Gln	Lys	Arg	Lys	Arg	Glu	Glu	Glu	Lys	Asp	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	
2570					2575					2580					
aag	aaa	aag	aaa	atg	atc	tct	act	acc	tca	aag	gaa	act	aag	aag	8268
Lys	Lys	Lys	Lys	Met	Ile	Ser	Thr	Thr	Ser	Lys	Glu	Thr	Lys	Lys	
2585					2590					2595					
gac	aca	aag	ctt	tac	tgt	atc	tgt	aaa	acg	cct	tat	gat	gaa	tct	8313
Asp	Thr	Lys	Leu	Tyr	Cys	Ile	Cys	Lys	Thr	Pro	Tyr	Asp	Glu	Ser	
2600					2605					2610					
aaa	ttt	tat	att	ggc	tgt	gat	cgg	tgt	cag	aat	tgg	tac	cat	ggg	8358
Lys	Phe	Tyr	Ile	Gly	Cys	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Trp	Tyr	His	Gly	
2615					2620					2625					

ES 2 672 989 T3

cgc	tgc	gtt	ggc	atc	ttg	caa	agt	gag	gca	gag	ctc	att	gat	gag	8403	
Arg	Cys	Val	Gly	Ile	Leu	Gln	Ser	Glu	Ala	Glu	Leu	Ile	Asp	Glu		
2630					2635					2640						
tat	gtc	tgt	cca	cag	tgc	cag	tca	aca	gag	gat	gcc	atg	aca	gtg	8448	
Tyr	Val	Cys	Pro	Gln	Cys	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Ala	Met	Thr	Val		
2645					2650					2655						
ctc	acg	cca	cta	aca	gag	aag	gat	tat	gag	ggg	ttg	aag	agg	gtg	8493	
Leu	Thr	Pro	Leu	Thr	Glu	Lys	Asp	Tyr	Glu	Gly	Leu	Lys	Arg	Val		
2660					2665					2670						
ctc	cgt	tcc	tta	cag	gcc	cat	aag	atg	gcc	tgg	cct	ttc	ctt	gaa	8538	
Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Ala	His	Lys	Met	Ala	Trp	Pro	Phe	Leu	Glu		
2675					2680					2685						
cca	gta	gac	cct	aat	gat	gca	cca	gat	tat	tat	ggg	gtt	att	aag	8583	
Pro	Val	Asp	Pro	Asn	Asp	Ala	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Val	Ile	Lys		
2690					2695					2700						
gaa	cct	atg	gac	ctt	gcc	acc	atg	gaa	gaa	aga	gta	caa	aga	cga	8628	
Glu	Pro	Met	Asp	Leu	Ala	Thr	Met	Glu	Glu	Arg	Val	Gln	Arg	Arg		
2705					2710					2715						
tat	tat	gaa	aag	ctg	acg	gaa	ttt	gtg	gca	gat	atg	acc	aaa	att	8673	
Tyr	Tyr	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Phe	Val	Ala	Asp	Met	Thr	Lys	Ile		
2720					2725					2730						
ttt	gat	aac	tgt	cgt	tac	tac	aat	cca	agt	gac	tcc	cca	ttt	tac	8718	
Phe	Asp	Asn	Cys	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Asp	Ser	Pro	Phe	Tyr		
2735					2740					2745						
cag	tgt	gca	gaa	gtt	ctc	gaa	tca	ttc	ttt	gta	cag	aaa	ttg	aaa	8763	
Gln	Cys	Ala	Glu	Val	Leu	Glu	Ser	Phe	Phe	Val	Gln	Lys	Leu	Lys		
2750					2755					2760						
ggc	ttc	aaa	gct	agc	agg	tct	cat	aac	aac	aaa	ctg	cag	tct	aca	8808	
Gly	Phe	Lys	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Asn	Asn	Lys	Leu	Gln	Ser	Thr		
2765					2770					2775						
gct	tct	taa	agttcagcgt	gttaacctaa	cataaaacac	agcaagaatc									8857	
Ala	Ser															
2780																
tggttgctctg	aactat	tttta	aattaaggag	ccagatg	ttt	ttagtcaggc	tatcctgaca									8917
agacttgacc	taaacttcgt	ttttattggt	cataacagtc	caattatatt	cttgccaat										8977	
tttgtccaac	ggacaagaaa	aaagcaaagt	caacgacacc	attatcttgt	caagatcaga										9037	
tggttttact	attgtggcag	aagcgagaaa	actttgttta	ttgaaaaaaa	aagaaaaaga										9097	
aagcaagaaa	aaaagatact	atgggggtcaa	gtgtaactcc	atggaaatgc	cacgtctgct										9157	
cttcagtgaa	gaagctggtt	tagagtctca	cagaaaactt	ttgactgtat	ttattttattg										9217	
ttgcaaaaaa	gacgcttttt	tattgctgcc	ctcatttgtc	agetaagtat	tttttcttat										9277	
aaaatccagc	cccggttaca	tataatcadc	tgtatcttat	catgattcct	gtaggtaaaa										9337	
gtacaagacg	acctctagat	gtcttttctt	tctatgaaag	gagctgctat	gtacacatgt										9397	
gcacacacac	acaactggga	atcaacaatg	agtttattgt	tcatggtaga	ttaaaattaa										9457	
gcttgcataa	aggttgggct	aagtggctct	tgggctacag	actctgttgc	cttgaatata										9517	
acagtacaat	ttgtcaatta	ctctgcacca	ggctaaagtg	agtaaaatct	atgtgaaggt										9577	
atcttgtttg	taaacatttg	tcagattcta	atTTTTTTct	tttgatttaa	aattcaacta										9637	
tggatgtata	tgaacaaaa	taaattggaga	taatttttct	cccacaaaa	aaaaaaaaaa										9697	
aaa															9700	

ES 2 672 989 T3

<210> 2
 <211> 2781
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Met Val Ser Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Asp Ala Glu Glu Thr
 1 5 10 15
 Gln Asp Ser Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Met Glu Glu Asp Asp Asp
 20 25 30
 Asp Ser Asp Tyr Pro Glu Glu Met Glu Asp Asp Asp Asp Ala Ser
 35 40 45
 Tyr Cys Thr Glu Ser Ser Phe Arg Ser His Ser Thr Tyr Ser Ser Thr
 50 55 60
 Pro Gly Arg Arg Lys Pro Arg Val His Arg Pro Arg Ser Pro Ile Leu
 65 70 75 80
 Glu Glu Lys Asp Ile Pro Pro Leu Glu Phe Pro Lys Ser Ser Glu Asp
 85 90 95
 Leu Met Val Pro Asn Glu His Ile Met Asn Val Ile Ala Ile Tyr Glu
 100 105 110
 Val Leu Arg Asn Phe Gly Thr Val Leu Arg Leu Ser Pro Phe Arg Phe
 115 120 125
 Glu Asp Phe Cys Ala Ala Leu Val Ser Gln Glu Gln Cys Thr Leu Met
 130 135 140
 Ala Glu Met His Val Val Leu Leu Lys Ala Val Leu Arg Glu Glu Asp
 145 150 155 160
 Thr Ser Asn Thr Thr Phe Gly Pro Ala Asp Leu Lys Asp Ser Val Asn
 165 170 175
 Ser Thr Leu Tyr Phe Ile Asp Gly Met Thr Trp Pro Glu Val Leu Arg
 180 185 190
 Val Tyr Cys Glu Ser Asp Lys Glu Tyr His His Val Leu Pro Tyr Gln
 195 200 205
 Glu Ala Glu Asp Tyr Pro Tyr Gly Pro Val Glu Asn Lys Ile Lys Val
 210 215 220

ES 2 672 989 T3

Leu Gln Phe Leu Val Asp Gln Phe Leu Thr Thr Asn Ile Ala Arg Glu
 225 230 235 240
 Glu Leu Met Ser Glu Gly Val Ile Gln Tyr Asp Asp His Cys Arg Val
 245 250 255
 Cys His Lys Leu Gly Asp Leu Leu Cys Cys Glu Thr Cys Ser Ala Val
 260 265 270
 Tyr His Leu Glu Cys Val Lys Pro Pro Leu Glu Glu Val Pro Glu Asp
 275 280 285
 Glu Trp Gln Cys Glu Val Cys Val Ala His Lys Val Pro Gly Val Thr
 290 295 300
 Asp Cys Val Ala Glu Ile Gln Lys Asn Lys Pro Tyr Ile Arg His Glu
 305 310 315 320
 Pro Ile Gly Tyr Asp Arg Ser Arg Arg Lys Tyr Trp Phe Leu Asn Arg
 325 330 335
 Arg Leu Ile Ile Glu Glu Asp Thr Glu Asn Glu Asn Glu Lys Lys Ile
 340 345 350
 Trp Tyr Tyr Ser Thr Lys Val Gln Leu Ala Glu Leu Ile Asp Cys Leu
 355 360 365
 Asp Lys Asp Tyr Trp Glu Ala Glu Leu Cys Lys Ile Leu Glu Glu Met
 370 375 380
 Arg Glu Glu Ile His Arg His Met Asp Ile Thr Glu Asp Leu Thr Asn
 385 390 395 400
 Lys Ala Arg Gly Ser Asn Lys Ser Phe Leu Ala Ala Ala Asn Glu Glu
 405 410 415
 Ile Leu Glu Ser Ile Arg Ala Lys Lys Gly Asp Ile Asp Asn Val Lys
 420 425 430
 Ser Pro Glu Glu Thr Glu Lys Asp Lys Asn Glu Thr Glu Asn Asp Ser
 435 440 445
 Lys Asp Ala Glu Lys Asn Arg Glu Glu Phe Glu Asp Gln Ser Leu Glu
 450 455 460
 Lys Asp Ser Asp Asp Lys Thr Pro Asp Asp Asp Pro Glu Gln Gly Lys
 465 470 475 480
 Ser Glu Val Gly Asp Phe Lys Ser Glu Lys Ser Asn Gly Glu Leu Ser
 485 490 495
 Glu Ser Pro Gly Ala Gly Lys Gly Ala Ser Gly Ser Thr Arg Ile Ile
 500 505 510
 Thr Arg Leu Arg Asn Pro Asp Ser Lys Leu Ser Gln Leu Lys Ser Gln
 515 520 525
 Gln Val Ala Ala Ala Ala His Glu Ala Asn Lys Leu Phe Lys Glu Gly
 530 535 540
 Lys Glu Val Leu Val Val Asn Ser Gln Gly Glu Ile Ser Arg Leu Ser

ES 2 672 989 T3

545	550	555	560
Thr Lys Lys Glu Val Ile Met Lys Gly Asn Ile Asn Asn Tyr Phe Lys 565			575
Leu Gly Gln Glu Gly Lys Tyr Arg Val Tyr His Asn Gln Tyr Ser Thr 580		585	590
Asn Ser Phe Ala Leu Asn Lys His Gln His Arg Glu Asp His Asp Lys 595		600	605
Arg Arg His Leu Ala His Lys Phe Cys Leu Thr Pro Ala Gly Glu Phe 610		615	620
Lys Trp Asn Gly Ser Val His Gly Ser Lys Val Leu Thr Ile Ser Thr 625		630	635
Leu Arg Leu Thr Ile Thr Gln Leu Glu Asn Asn Ile Pro Ser Ser Phe 645		650	655
Leu His Pro Asn Trp Ala Ser His Arg Ala Asn Trp Ile Lys Ala Val 660		665	670
Gln Met Cys Ser Lys Pro Arg Glu Phe Ala Leu Ala Leu Ala Ile Leu 675		680	685
Glu Cys Ala Val Lys Pro Val Val Met Leu Pro Ile Trp Arg Glu Phe 690		695	700
Leu Gly His Thr Arg Leu His Arg Met Thr Ser Ile Glu Arg Glu Glu 705		710	715
Lys Glu Lys Val Lys Lys Lys Glu Lys Lys Gln Glu Glu Glu Thr 725		730	735
Met Gln Gln Ala Thr Trp Val Lys Tyr Thr Phe Pro Val Lys His Gln 740		745	750
Val Trp Lys Gln Lys Gly Glu Glu Tyr Arg Val Thr Gly Tyr Gly Gly 755		760	765
Trp Ser Trp Ile Ser Lys Thr His Val Tyr Arg Phe Val Pro Lys Leu 770		775	780
Pro Gly Asn Thr Asn Val Asn Tyr Arg Lys Ser Leu Glu Gly Thr Lys 785		790	795
Asn Asn Met Asp Glu Asn Met Asp Glu Ser Asp Lys Arg Lys Cys Ser 805		810	815
Arg Ser Pro Lys Lys Ile Lys Ile Glu Pro Asp Ser Glu Lys Asp Glu 820		825	830
Val Lys Gly Ser Asp Ala Ala Lys Gly Ala Asp Gln Asn Glu Met Asp 835		840	845
Ile Ser Lys Ile Thr Glu Lys Lys Asp Gln Asp Val Lys Glu Leu Leu 850		855	860
Asp Ser Asp Ser Asp Lys Pro Cys Lys Glu Glu Pro Met Glu Val Asp 865		870	875
			880

ES 2 672 989 T3

Asp Asp Met Lys Thr Glu Ser His Val Asn Cys Gln Glu Ser Ser Gln
885 890 895

Val Asp Val Val Asn Val Ser Glu Gly Phe His Leu Arg Thr Ser Tyr
900 905 910

Lys Lys Lys Thr Lys Ser Ser Lys Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Arg
915 920 925

Ile Lys Gln Phe Thr Leu Glu Glu Lys Gln Arg Leu Glu Lys Ile Lys
930 935 940

Leu Glu Gly Gly Ile Lys Gly Ile Gly Lys Thr Ser Thr Asn Ser Ser
945 950 955 960

Lys Asn Leu Ser Glu Ser Pro Val Ile Thr Lys Ala Lys Glu Gly Cys
965 970 975

Gln Ser Asp Ser Met Arg Gln Glu Gln Ser Pro Asn Ala Asn Asn Asp
980 985 990

Gln Pro Glu Asp Leu Ile Gln Gly Cys Ser Gln Ser Asp Ser Ser Val
995 1000 1005

Leu Arg Met Ser Asp Pro Ser His Thr Thr Asn Lys Leu Tyr Pro
1010 1015 1020

Lys Asp Arg Val Leu Asp Asp Val Ser Ile Arg Ser Pro Glu Thr
1025 1030 1035

Lys Cys Pro Lys Gln Asn Ser Ile Glu Asn Asp Ile Glu Glu Lys
1040 1045 1050

Val Ser Asp Leu Ala Ser Arg Gly Gln Glu Pro Thr Lys Ser Lys
1055 1060 1065

Thr Lys Gly Asn Asp Phe Phe Ile Asp Asp Ser Lys Leu Ala Ser
1070 1075 1080

Ala Asp Asp Ile Gly Thr Leu Ile Cys Lys Asn Lys Lys Pro Leu
1085 1090 1095

Ile Gln Glu Glu Ser Asp Thr Ile Val Ser Ser Ser Lys Ser Ala
1100 1105 1110

Leu His Ser Ser Val Pro Lys Ser Thr Asn Asp Arg Asp Ala Thr
1115 1120 1125

Pro Leu Ser Arg Ala Met Asp Phe Glu Gly Lys Leu Gly Cys Asp
1130 1135 1140

Ser Glu Ser Asn Ser Thr Leu Glu Asn Ser Ser Asp Thr Val Ser
1145 1150 1155

Ile Gln Asp Ser Ser Glu Glu Asp Met Ile Val Gln Asn Ser Asn
1160 1165 1170

Glu Ser Ile Ser Glu Gln Phe Arg Thr Arg Glu Gln Asp Val Glu
1175 1180 1185

ES 2 672 989 T3

Val	Leu	Glu	Pro	Leu	Lys	Cys	Glu	Leu	Val	Ser	Gly	Glu	Ser	Thr
	1190					1195					1200			
Gly	Asn	Cys	Glu	Asp	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Gly	Thr	Glu	Ala	Asn
	1205					1210					1215			
Gly	Lys	Lys	Pro	Ser	Gln	Gln	Lys	Lys	Leu	Glu	Glu	Arg	Pro	Val
	1220					1225					1230			
Asn	Lys	Cys	Ser	Asp	Gln	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys
	1235					1240					1245			
Lys	Asn	Asn	Glu	Asn	Arg	Glu	Ser	Glu	Lys	Lys	Gly	Gln	Arg	Thr
	1250					1255					1260			
Ser	Thr	Phe	Gln	Ile	Asn	Gly	Lys	Asp	Asn	Lys	Pro	Lys	Ile	Tyr
	1265					1270					1275			
Leu	Lys	Gly	Glu	Cys	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Glu	Ser	Arg	Val	Val
	1280					1285					1290			
Ser	Gly	Asn	Val	Glu	Pro	Lys	Val	Asn	Asn	Ile	Asn	Lys	Ile	Ile
	1295					1300					1305			
Pro	Glu	Asn	Asp	Ile	Lys	Ser	Leu	Thr	Val	Lys	Glu	Ser	Ala	Ile
	1310					1315					1320			
Arg	Pro	Phe	Ile	Asn	Gly	Asp	Val	Ile	Met	Glu	Asp	Phe	Asn	Glu
	1325					1330					1335			
Arg	Asn	Ser	Ser	Glu	Thr	Lys	Ser	His	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp
	1340					1345					1350			
Ala	Glu	Gly	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Pro	Ser	Thr
	1355					1360					1365			
Lys	Glu	Ser	Asp	Ser	Thr	Gln	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Ala	Ser	Cys
	1370					1375					1380			
Pro	Glu	Ser	Asn	Ser	Val	Asn	Gln	Val	Glu	Asp	Met	Glu	Ile	Glu
	1385					1390					1395			
Thr	Ser	Glu	Val	Lys	Lys	Val	Thr	Ser	Ser	Pro	Ile	Thr	Ser	Glu
	1400					1405					1410			
Glu	Glu	Ser	Asn	Leu	Ser	Asn	Asp	Phe	Ile	Asp	Glu	Asn	Gly	Leu
	1415					1420					1425			
Pro	Ile	Asn	Lys	Asn	Glu	Asn	Val	Asn	Gly	Glu	Ser	Lys	Arg	Lys
	1430					1435					1440			
Thr	Val	Ile	Thr	Glu	Val	Thr	Thr	Met	Thr	Ser	Thr	Val	Ala	Thr
	1445					1450					1455			
Glu	Ser	Lys	Thr	Val	Ile	Lys	Val	Glu	Lys	Gly	Asp	Lys	Gln	Thr
	1460					1465					1470			
Val	Val	Ser	Ser	Thr	Glu	Asn	Cys	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Thr	Thr
	1475					1480					1485			
Thr	Thr	Thr	Thr	Val	Thr	Lys	Leu	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly

ES 2 672 989 T3

1490	1495	1500
Ser Val Asp Ile Ile Ser 1505	Val Lys Glu Gln Ser 1510	Lys Thr Val Val 1515
Thr Thr Thr Val Thr Asp 1520	Ser Leu Thr Thr Thr 1525	Gly Gly Thr Leu 1530
Val Thr Ser Met Thr Val 1535	Ser Lys Glu Tyr Ser 1540	Thr Arg Asp Lys 1545
Val Lys Leu Met Lys Phe 1550	Ser Arg Pro Lys Lys 1555	Thr Arg Ser Gly 1560
Thr Ala Leu Pro Ser Tyr 1565	Arg Lys Phe Val Thr 1570	Lys Ser Thr Lys 1575
Lys Ser Ile Phe Val Leu 1580	Pro Asn Asp Asp Leu 1585	Lys Lys Leu Ala 1590
Arg Lys Gly Gly Ile Arg 1595	Glu Val Pro Tyr Phe 1600	Asn Tyr Asn Ala 1605
Lys Pro Ala Leu Asp Ile 1610	Trp Pro Tyr Pro Ser 1615	Pro Arg Pro Thr 1620
Phe Gly Ile Thr Trp Arg 1625	Tyr Arg Leu Gln Thr 1630	Val Lys Ser Leu 1635
Ala Gly Val Ser Leu Met 1640	Leu Arg Leu Leu Trp 1645	Ala Ser Leu Arg 1650
Trp Asp Asp Met Ala Ala 1655	Lys Val Pro Pro Gly 1660	Gly Gly Gly Ser Thr 1665
Arg Thr Glu Thr Ser Glu 1670	Thr Glu Ile Thr Thr 1675	Thr Glu Ile Ile 1680
Lys Arg Arg Asp Val Gly 1685	Pro Tyr Gly Ile Arg 1690	Phe Glu Tyr Cys 1695
Ile Arg Lys Ile Ile Cys 1700	Pro Ile Gly Val Pro 1705	Glu Thr Pro Lys 1710
Glu Thr Pro Thr Pro Gln 1715	Arg Lys Gly Leu Arg 1720	Ser Ser Ala Leu 1725
Arg Pro Lys Arg Pro Glu 1730	Thr Pro Lys Gln Thr 1735	Gly Pro Val Ile 1740
Ile Glu Thr Trp Val Ala 1745	Glu Glu Leu Glu 1750	Leu Trp Glu Ile 1755
Arg Ala Phe Ala Glu Arg 1760	Val Glu Lys Glu Lys 1765	Ala Gln Ala Val 1770
Glu Gln Gln Ala Lys Lys 1775	Arg Leu Glu Gln Gln 1780	Lys Pro Thr Val 1785
Ile Ala Thr Ser Thr Thr 1790	Ser Pro Thr Ser Ser 1795	Thr Thr Ser Thr 1800

ES 2 672 989 T3

Ile	Ser	Pro	Ala	Gln	Lys	Val	Met	Val	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Ser
1805						1810					1815			
Val	Thr	Thr	Gly	Thr	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Thr	Lys	Val	Gly	Ser
1820						1825					1830			
Pro	Ala	Thr	Val	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Lys	Asn	Phe	His	Gln	Thr
1835						1840					1845			
Phe	Ala	Thr	Trp	Val	Lys	Gln	Gly	Gln	Ser	Asn	Ser	Gly	Val	Val
1850						1855					1860			
Gln	Val	Gln	Gln	Lys	Val	Leu	Gly	Ile	Ile	Pro	Ser	Ser	Thr	Gly
1865						1870					1875			
Thr	Ser	Gln	Gln	Thr	Phe	Thr	Ser	Phe	Gln	Pro	Arg	Thr	Ala	Thr
1880						1885					1890			
Val	Thr	Ile	Arg	Pro	Asn	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Ser
1895						1900					1905			
Asn	Ser	Gln	Val	Ile	Thr	Gly	Pro	Gln	Ile	Arg	Pro	Gly	Met	Thr
1910						1915					1920			
Val	Ile	Arg	Thr	Pro	Leu	Gln	Gln	Ser	Thr	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile
1925						1930					1935			
Ile	Arg	Thr	Pro	Val	Met	Val	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Gln	Val
1940						1945					1950			
Met	Thr	Gln	Ile	Ile	Arg	Gly	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ser
1955						1960					1965			
Ala	Pro	Asn	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Pro	Gly	Gln	Lys	Ser	Leu	Thr
1970						1975					1980			
Ser	Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Ile	Gln	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Pro
1985						1990					1995			
Pro	Arg	Pro	Gln	Gln	Gly	Gln	Val	Lys	Leu	Thr	Met	Ala	Gln	Leu
2000						2005					2010			
Thr	Gln	Leu	Thr	Gln	Gly	His	Gly	Gly	Asn	Gln	Gly	Leu	Thr	Val
2015						2020					2025			
Val	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Thr	Thr	Gly	Gln	Leu	Gln	Leu	Ile
2030						2035					2040			
Pro	Gln	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln	Leu	Met
2045						2050					2055			
Gln	Ala	Ala	Met	Pro	Asn	Gly	Thr	Val	Gln	Arg	Phe	Leu	Phe	Thr
2060						2065					2070			
Pro	Leu	Ala	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
2075						2080					2085			
Val	Ser	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Glu	Gln	Arg	Gln	Ser	Lys
2090						2095					2100			

ES 2 672 989 T3

Leu Ser Pro Gln Met Gln Val His Gln Asp Lys Thr Leu Pro Pro
 2105 2110 2115
 Ala Gln Ser Ser Ser Val Gly Pro Ala Lys Ala Gln Pro Gln Thr
 2120 2125 2130
 Ala Gln Pro Ser Ala Arg Pro Gln Pro Gln Thr Gln Pro Gln Ser
 2135 2140 2145
 Pro Ala Gln Pro Glu Val Gln Thr Gln Pro Glu Val Gln Thr Gln
 2150 2155 2160
 Thr Thr Val Ser Ser His Val Pro Ser Glu Ala Gln Pro Thr His
 2165 2170 2175
 Ala Gln Ser Ser Lys Pro Gln Val Ala Ala Gln Ser Gln Pro Gln
 2180 2185 2190
 Ser Asn Val Gln Gly Gln Ser Pro Val Arg Val Gln Ser Pro Ser
 2195 2200 2205
 Gln Thr Arg Ile Arg Pro Ser Thr Pro Ser Gln Leu Ser Pro Gly
 2210 2215 2220
 Gln Gln Ser Gln Val Gln Thr Thr Thr Ser Gln Pro Ile Pro Ile
 2225 2230 2235
 Gln Pro His Thr Ser Leu Gln Ile Pro Ser Gln Gly Gln Pro Gln
 2240 2245 2250
 Ser Gln Pro Gln Val Gln Ser Ser Thr Gln Thr Leu Ser Ser Gly
 2255 2260 2265
 Gln Thr Leu Asn Gln Val Ser Val Ser Ser Pro Ser Arg Pro Gln
 2270 2275 2280
 Leu Gln Ile Gln Gln Pro Gln Pro Gln Val Ile Ala Val Pro Gln
 2285 2290 2295
 Leu Gln Gln Gln Val Gln Val Leu Ser Gln Ile Gln Ser Gln Val
 2300 2305 2310
 Val Ala Gln Ile Gln Ala Gln Gln Ser Gly Val Pro Gln Gln Ile
 2315 2320 2325
 Lys Leu Gln Leu Pro Ile Gln Ile Gln Gln Ser Ser Ala Val Gln
 2330 2335 2340
 Thr His Gln Ile Gln Asn Val Val Thr Val Gln Ala Ala Ser Val
 2345 2350 2355
 Gln Glu Gln Leu Gln Arg Val Gln Gln Leu Arg Asp Gln Gln Gln
 2360 2365 2370
 Lys Lys Lys Gln Gln Gln Ile Glu Ile Lys Arg Glu His Thr Leu
 2375 2380 2385
 Gln Ala Ser Asn Gln Ser Glu Ile Ile Gln Lys Gln Val Val Met
 2390 2395 2400
 Lys His Asn Ala Val Ile Glu His Leu Lys Gln Lys Lys Ser Met

ES 2 672 989 T3

2405 Thr Pro Ala Glu Arg Glu 2420	2410 Glu Glu Asn Gln Arg Met 2425	2415 Ile Val Cys Asn 2430
Gln Val Met Lys Tyr Ile 2435	Leu Asp Lys Ile Asp 2440	Lys Glu Glu Lys 2445
Gln Ala Ala Lys Lys Arg 2450	Lys Arg Glu Glu Ser 2455	Val Glu Gln Lys 2460
Arg Ser Lys Gln Asn Ala 2465	Thr Lys Leu Ser Ala 2470	Leu Leu Phe Lys 2475
His Lys Glu Gln Leu Arg 2480	Ala Glu Ile Leu Lys 2485	Lys Arg Ala Leu 2490
Leu Asp Lys Asp Leu Gln 2495	Ile Glu Val Gln Glu 2500	Glu Leu Lys Arg 2505
Asp Leu Lys Ile Lys Lys 2510	Glu Lys Asp Leu Met 2515	Gln Leu Ala Gln 2520
Ala Thr Ala Val Ala Ala 2525	Pro Cys Pro Pro Val 2530	Thr Pro Val Leu 2535
Pro Ala Pro Pro Ala Pro 2540	Pro Pro Ser Pro Pro 2545	Pro Pro Pro Gly 2550
Val Gln His Thr Gly Leu 2555	Leu Ser Thr Pro Thr 2560	Leu Pro Val Ala 2565
Ser Gln Lys Arg Lys Arg 2570	Glu Glu Glu Lys Asp 2575	Ser Ser Ser Lys 2580
Ser Lys Lys Lys Lys Met 2585	Ile Ser Thr Thr Ser 2590	Lys Glu Thr Lys 2595
Lys Asp Thr Lys Leu Tyr 2600	Cys Ile Cys Lys Thr 2605	Pro Tyr Asp Glu 2610
Ser Lys Phe Tyr Ile Gly 2615	Cys Asp Arg Cys Gln 2620	Asn Trp Tyr His 2625
Gly Arg Cys Val Gly Ile 2630	Leu Gln Ser Glu Ala 2635	Glu Leu Ile Asp 2640
Glu Tyr Val Cys Pro Gln 2645	Cys Gln Ser Thr Glu 2650	Asp Ala Met Thr 2655
Val Leu Thr Pro Leu Thr 2660	Glu Lys Asp Tyr Glu 2665	Gly Leu Lys Arg 2670
Val Leu Arg Ser Leu Gln 2675	Ala His Lys Met Ala 2680	Trp Pro Phe Leu 2685
Glu Pro Val Asp Pro Asn 2690	Asp Ala Pro Asp Tyr 2695	Tyr Gly Val Ile 2700
Lys Glu Pro Met Asp Leu 2705	Ala Thr Met Glu Glu 2710	Arg Val Gln Arg 2715

ES 2 672 989 T3

Arg	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Phe	Val	Ala	Asp	Met	Thr	Lys
	2720					2725					2730			
Ile	Phe	Asp	Asn	Cys	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Asp	Ser	Pro	Phe
	2735					2740					2745			
Tyr	Gln	Cys	Ala	Glu	Val	Leu	Glu	Ser	Phe	Phe	Val	Gln	Lys	Leu
	2750					2755					2760			
Lys	Gly	Phe	Lys	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Asn	Asn	Lys	Leu	Gln	Ser
	2765					2770					2775			
Thr	Ala	Ser												
	2780													

5 <210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> BPTF ARNh1

<400> 3
 tggctgtgat cgggtgcaga attgtacc 29

15 <210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> BPTF ARNh2

<400> 4
 ggtgatgaag cataatgctg taatagaac 29

25 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> BPTF ARNh3

<400> 5
 atttagattc atcataaggc g 21

35

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de pronosis del melanoma, que comprende:
- (i) medir el nivel del factor de transcripción de los dedos de PHD del bromodominio (BPTF) en una muestra biológica obtenida de un sujeto sospechoso de padecer melanoma;
- 5 (ii) comparar el nivel de BPTF en la muestra del sujeto con el nivel promedio de BPTF procedente de una o más muestras biológicas control;
- (iii) proporcionar una pronosis que indique si el sujeto puede padecer melanoma basándose en que tenga un nivel menor o mayor de BPTF, en comparación con el nivel promedio de BPTF en los controles.
- 2.- Un método para determinar si un sujeto padece melanoma, que comprende:
- 10 (i) medir el nivel de BPTF en una muestra biológica obtenida de un sujeto sospechoso de padecer melanoma;
- (ii) comparar el nivel de BPTF en la muestra del sujeto con el nivel promedio de BPTF procedente de una o más muestras biológicas control; y
- (iii) determinar si el sujeto padece melanoma basándose en que tenga un nivel significativamente menor o mayor de BPTF, en comparación con los niveles promedio de BPTF en los controles.
- 15 3.- Un método para determinar si un melanoma en un sujeto está avanzando o está en remisión, que comprende:
- (i) medir el nivel de BPTF en una muestra biológica obtenida del sujeto en un primer momento;
- (ii) medir el nivel de BPTF en una muestra biológica obtenida del sujeto en un segundo momento;
- (iii) comparar los niveles de BPTF del primer momento con los niveles del segundo momento; y
- 20 (iv) determinar si el melanoma está avanzando o está en recuperación basándose en el cambio en los niveles de BPTF entre los dos momentos, en el que una disminución en los niveles de BPTF entre el primer momento y el segundo momento indica que el cáncer está en remisión, y en el que un aumento en los niveles de BPTF entre el primer momento y el segundo momento indica que el cáncer está avanzando.
- 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra biológica del sujeto procede de una biopsia de tejido.
- 25 5.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas una o más muestras biológicas control proceden de biopsias de tejidos de nevi benignos, preferiblemente en el que las muestras biológicas control comprenden muestras procedentes del sujeto, o en el que las muestras biológicas control comprenden muestras no procedentes del sujeto.
- 6.- El método de la reivindicación 3, en el que si los niveles de BPTF aumentan entre el primer momento y el segundo momento, se proporciona un agente inhibidor de BPTF para la administración al sujeto.
- 30 7.- Un agente para su uso para tratar el melanoma en un sujeto, siendo el agente una cantidad eficaz de un ácido nucleico inhibidor de BPTF que inhibe la expresión de BPTF, opcionalmente en el que el agente es una molécula de ARNi.
- 8.- El agente para su uso según la reivindicación 7, en el que la inhibición de la expresión de BPTF provoca la inhibición o la prevención de la proliferación o la migración de células cancerosas.
- 35 9.- El agente para su uso según la reivindicación 7, en el que el agente se va a administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos anticáncer adicionales, preferiblemente en el que dichos uno o más agentes terapéuticos anticáncer adicionales se seleccionan del grupo que consiste en análogos del platino, agentes alquilantes, sulfonatos de alquilo, andrógenos, antiadrenales, antiandrógenos, antibióticos, antiestrógenos, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromataasa, antimetabolitos, análogos del ácido fólico, etileniminas y metilamelaminas, reponedores del ácido fólico, gas mostaza, nitrosoureas, análogos de purina, análogos de pirimidina, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la timidilato sintasa, anticuerpos anticáncer, productos quimioterapéuticos, agentes de desmetilación, y agentes terapéuticos dirigidos.
- 40 10.- El agente para su uso según la reivindicación 7, en el que el agente es un vector que comprende un ácido nucleico inhibidor de BPTF, preferiblemente en el que el vector comprende un vector de expresión, o en el que el vector comprende un vector retrovírico competente en la replicación.
- 45 11.- Una composición que comprende un inhibidor de BPTF que comprende una molécula de ARNi específica para BPTF y un producto terapéutico anticáncer de primera línea para su uso en el tratamiento del melanoma.

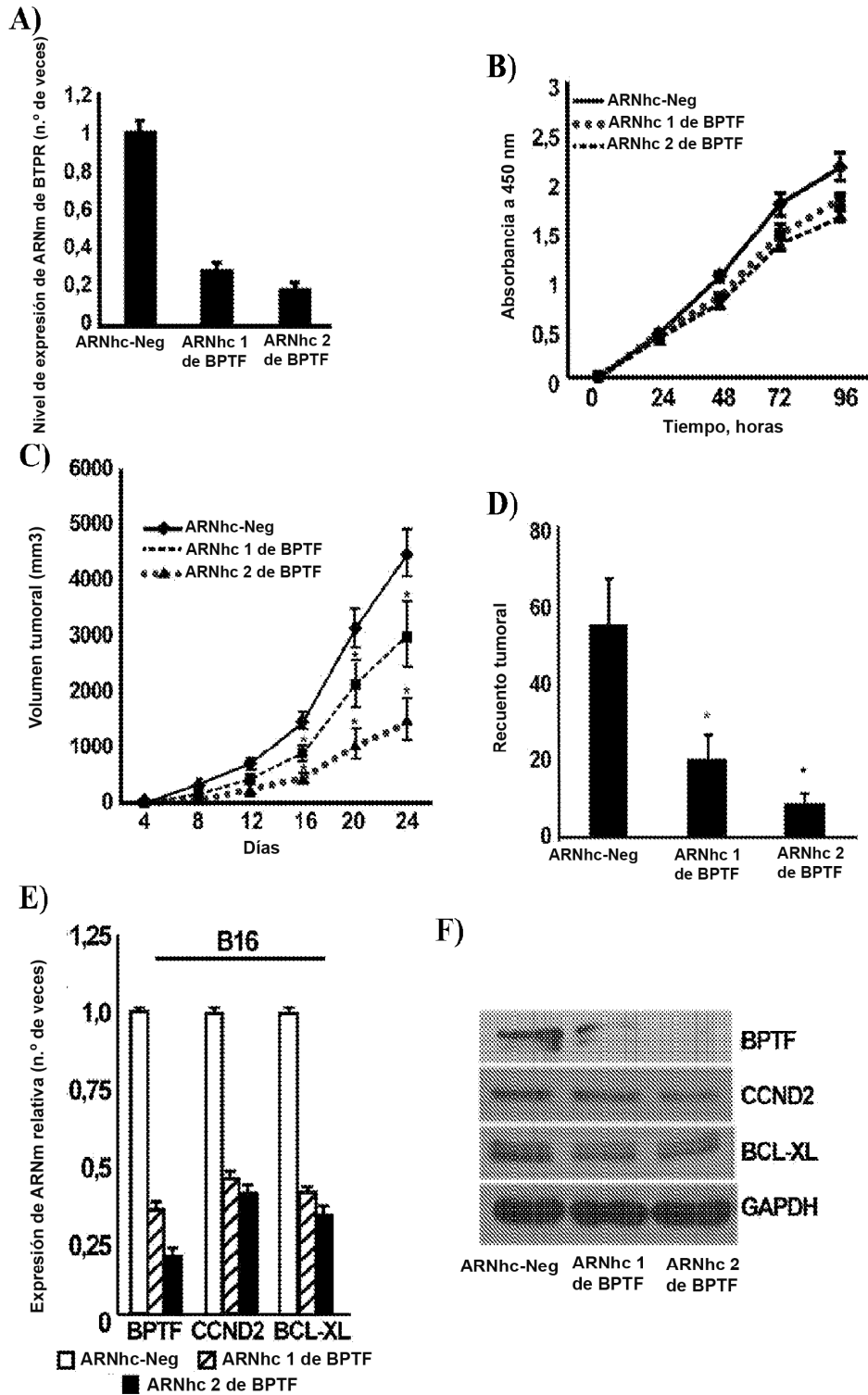


FIGURA 1A-F

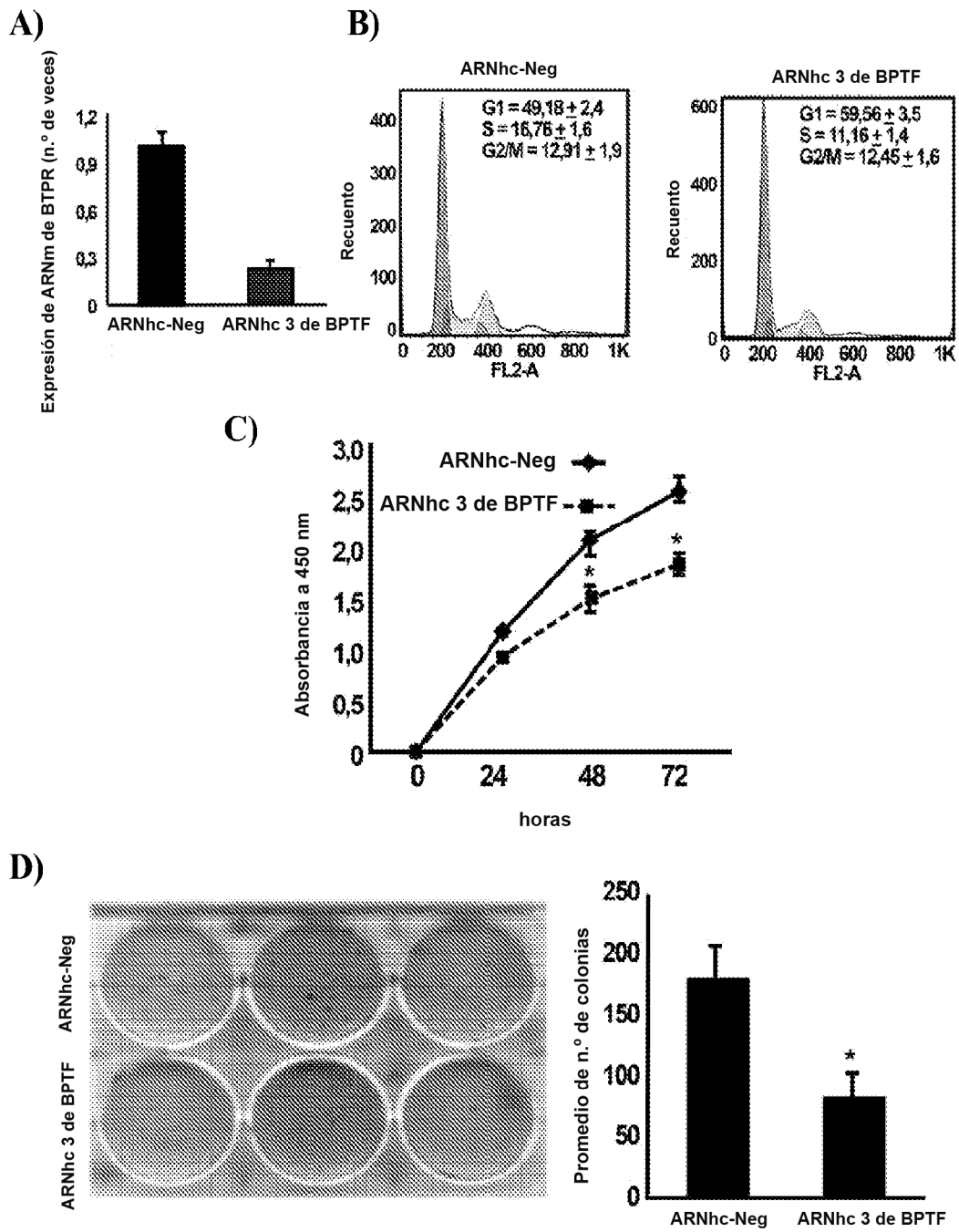
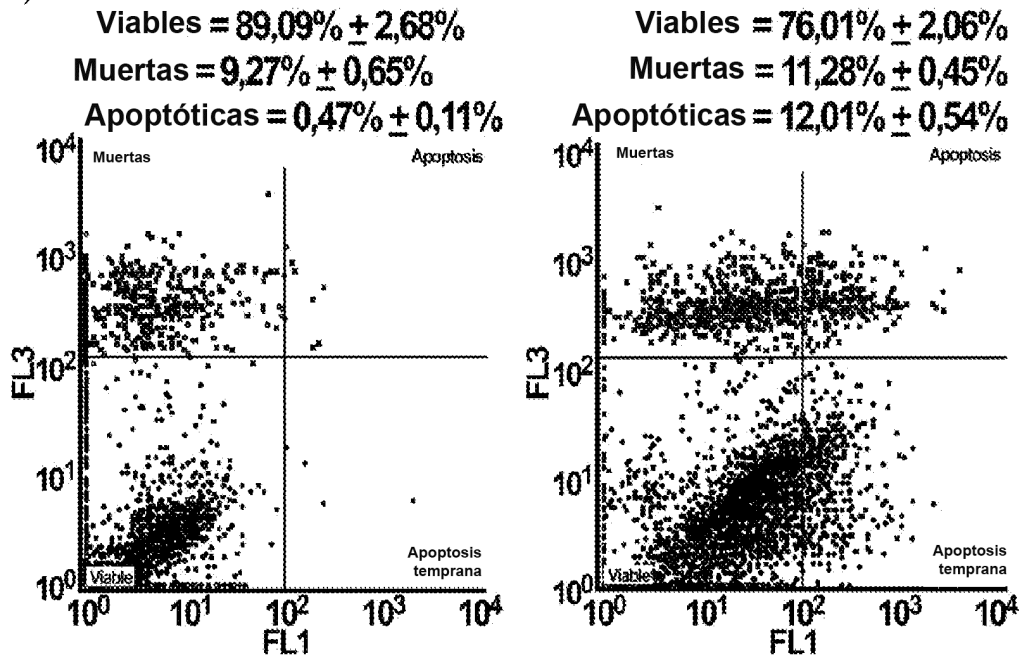
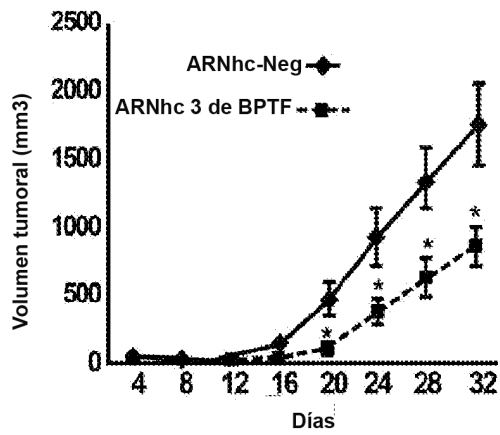


FIGURA 2A-D

E)



F)



G)

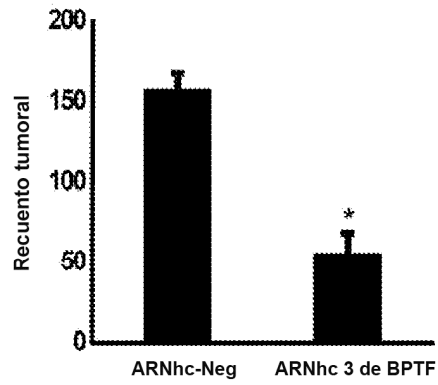


FIGURA 2E-G

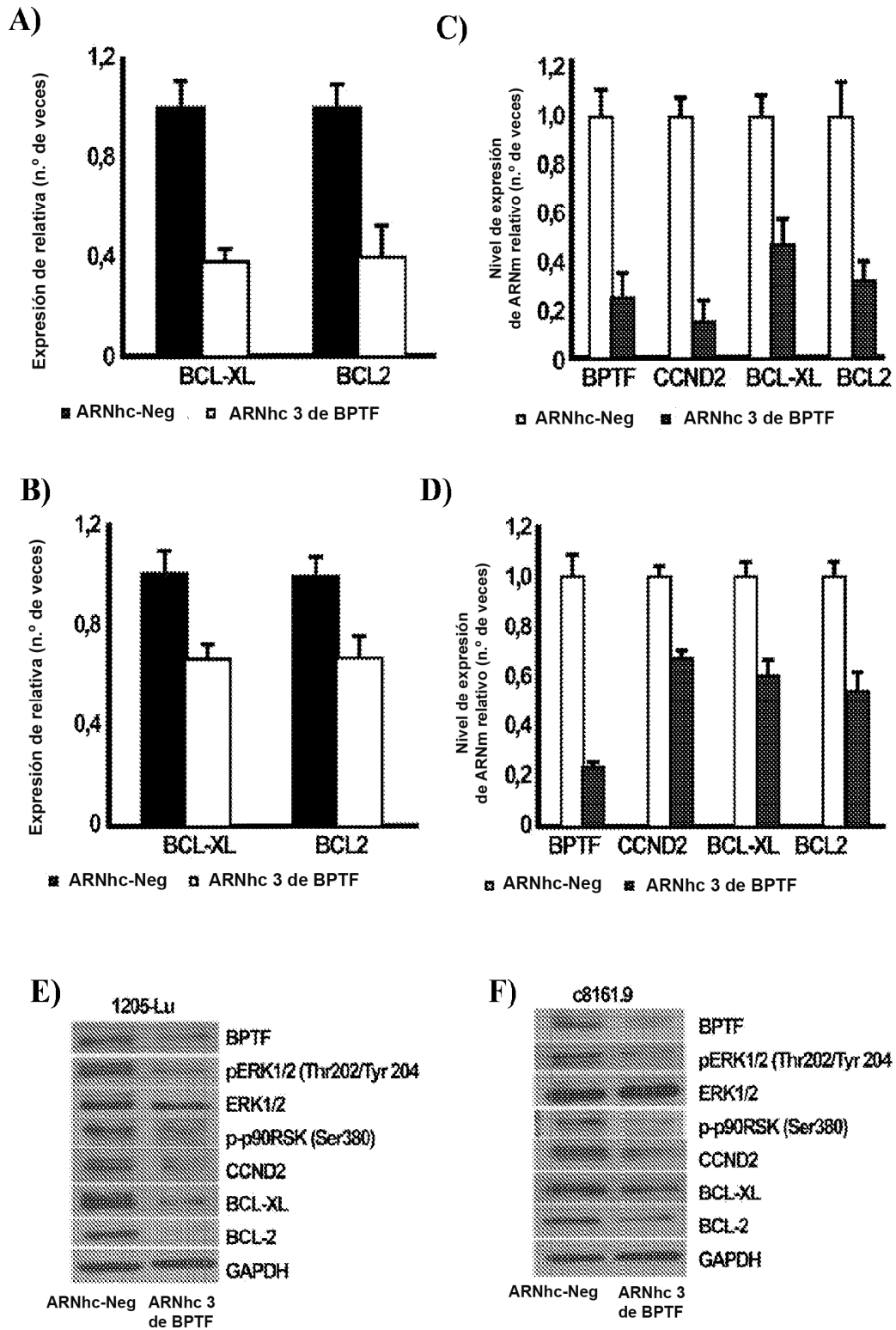


FIGURA 3A-F

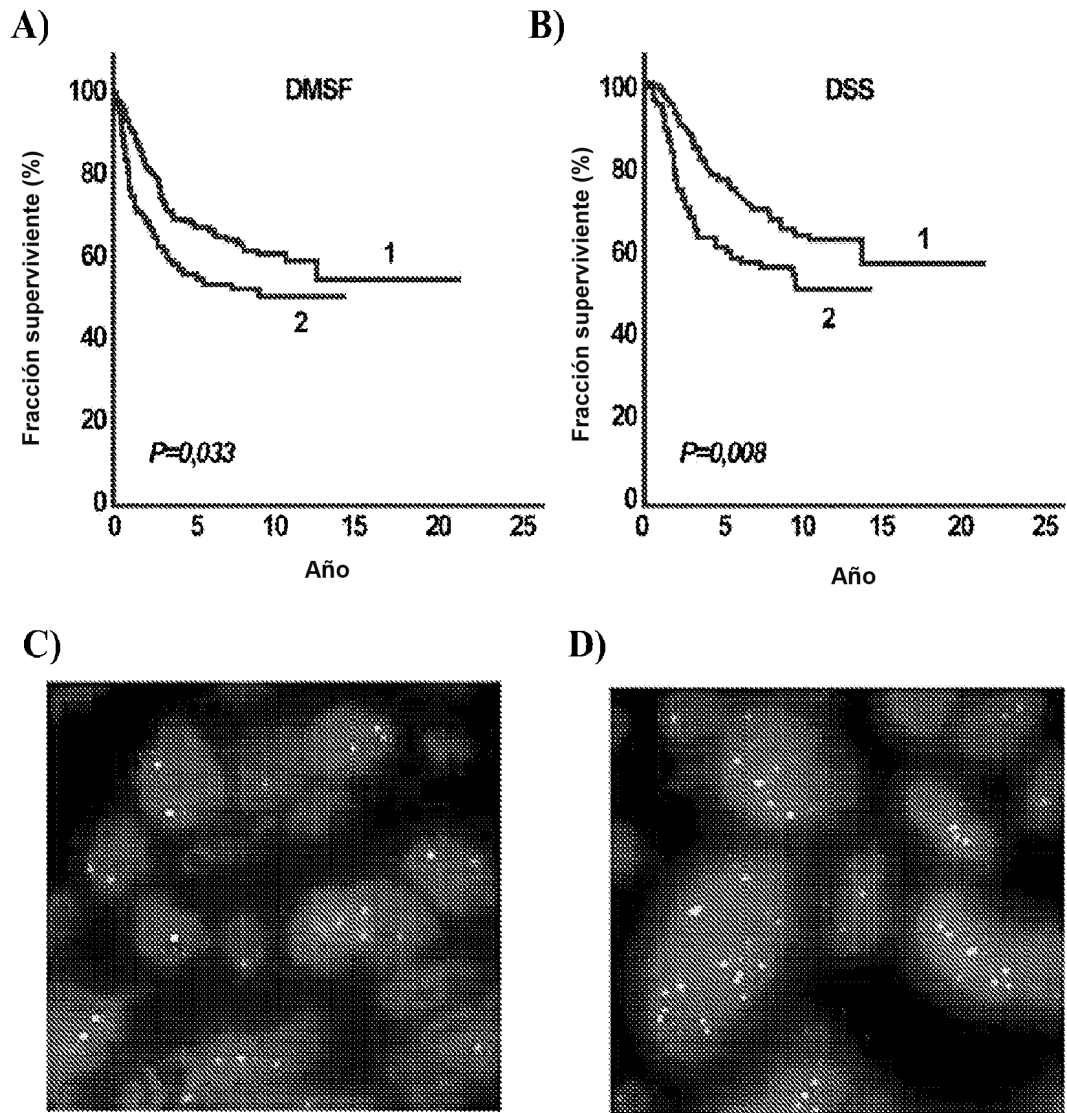


FIGURA 4A-D

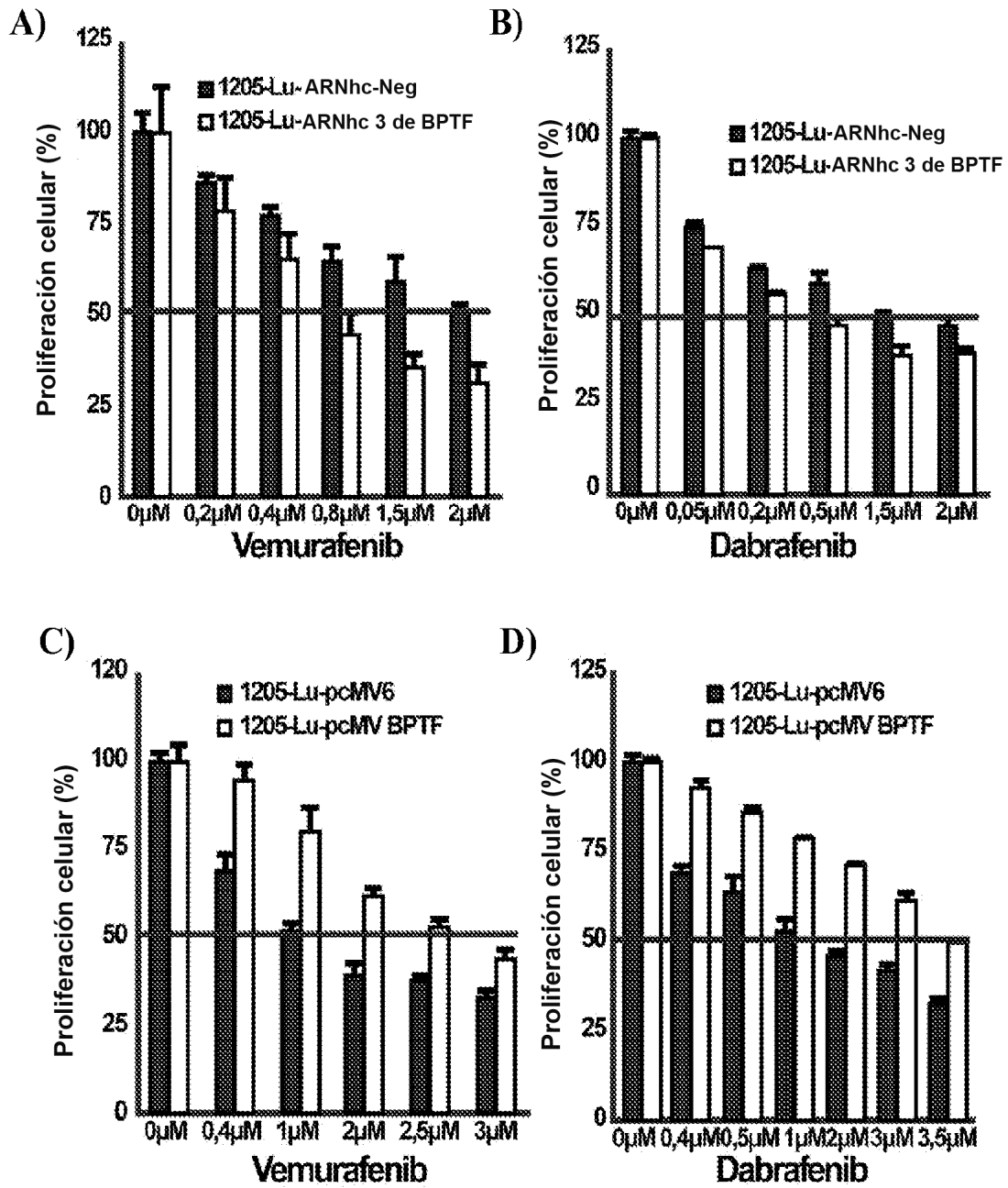
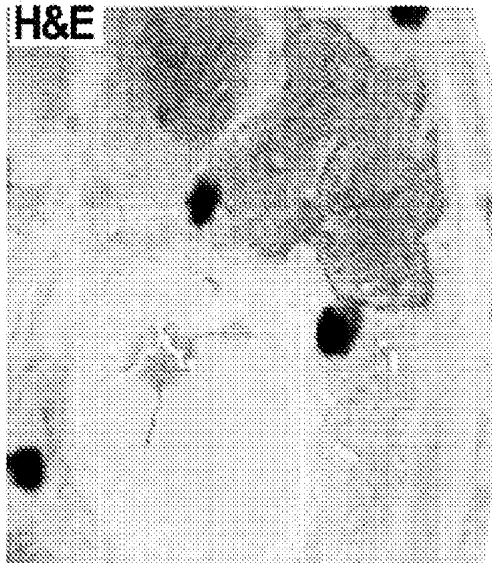
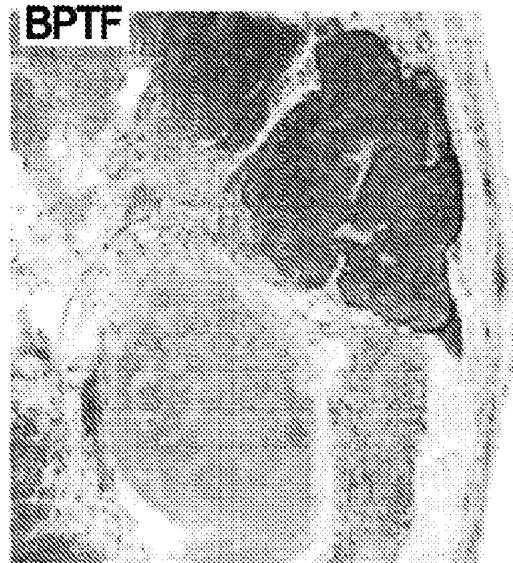


FIGURA 5A-D

E)



F)



G)



H)

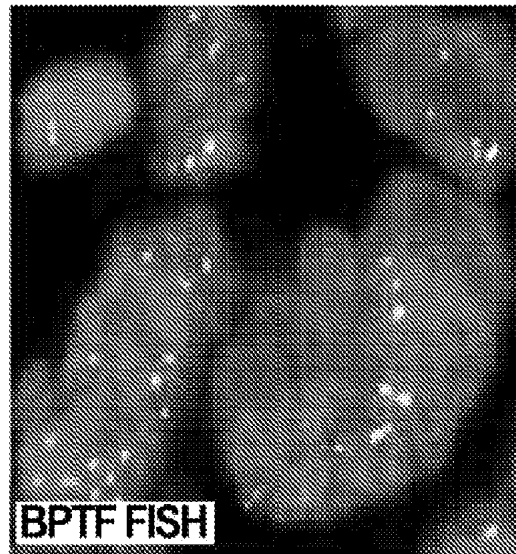
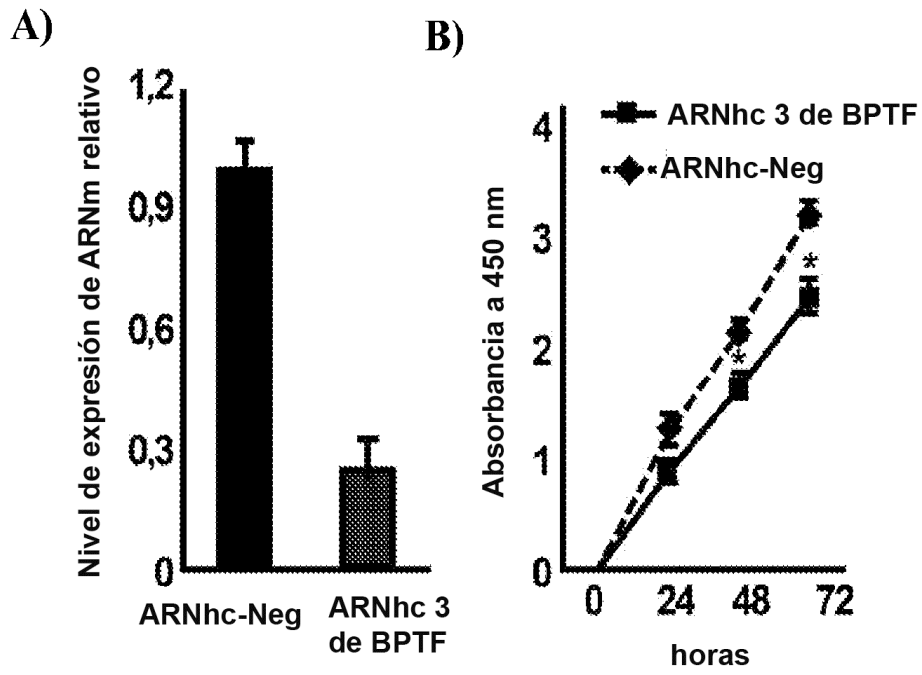


FIGURA 5E-H



C) ARNhc-Neg ARNhc 3 de BPTF

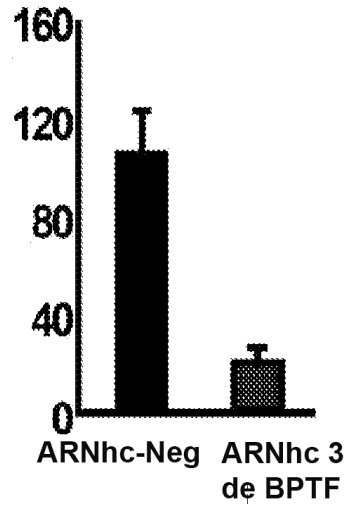
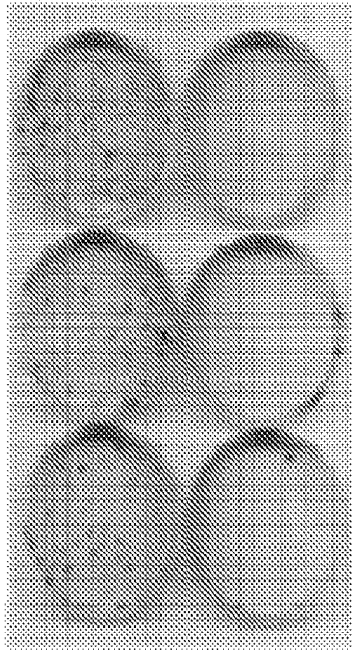
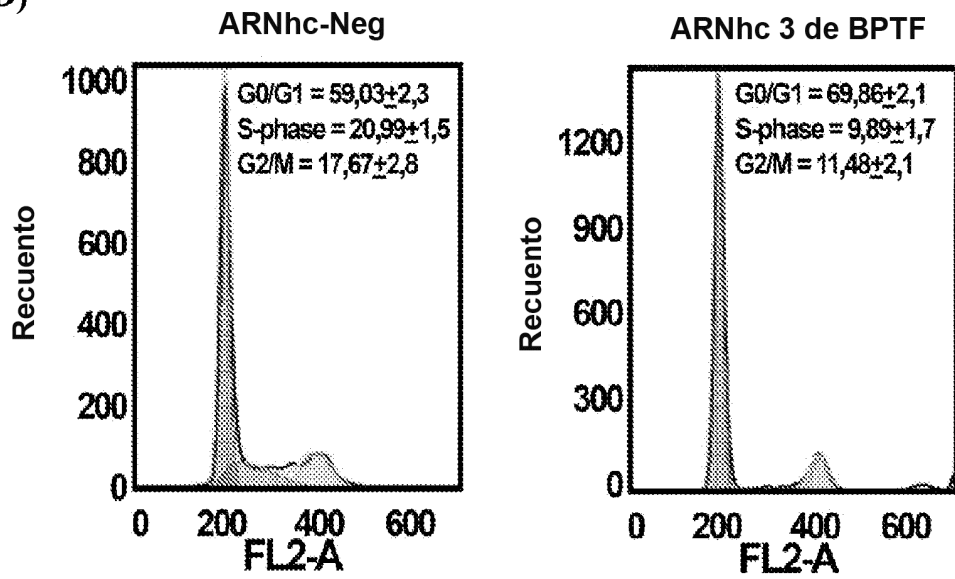


FIGURA 6A-C

D)



E)

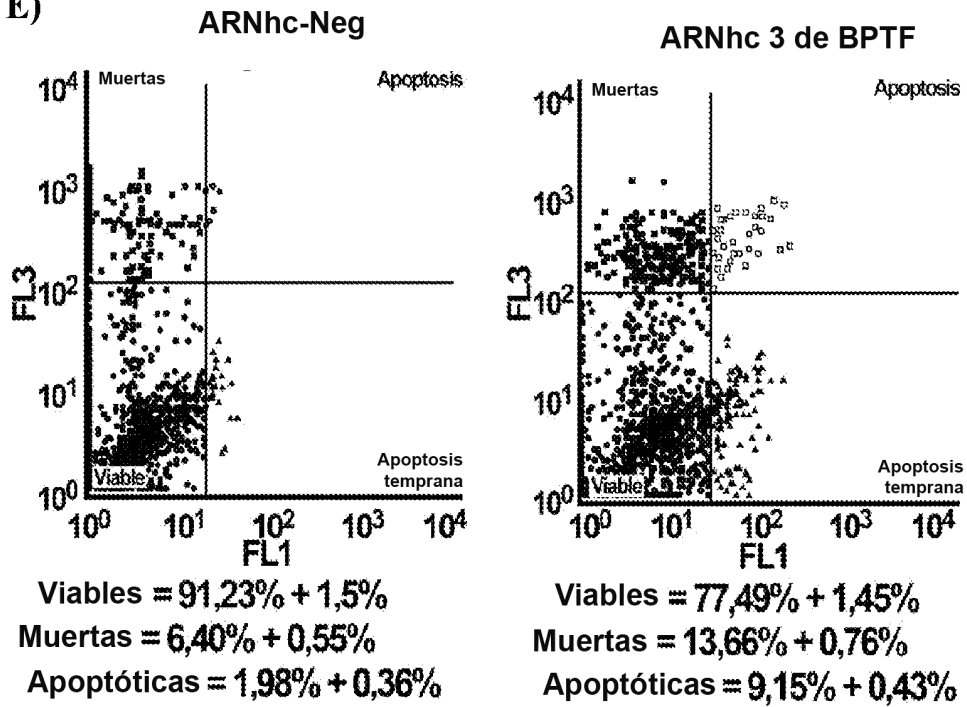


FIGURA 6D-E

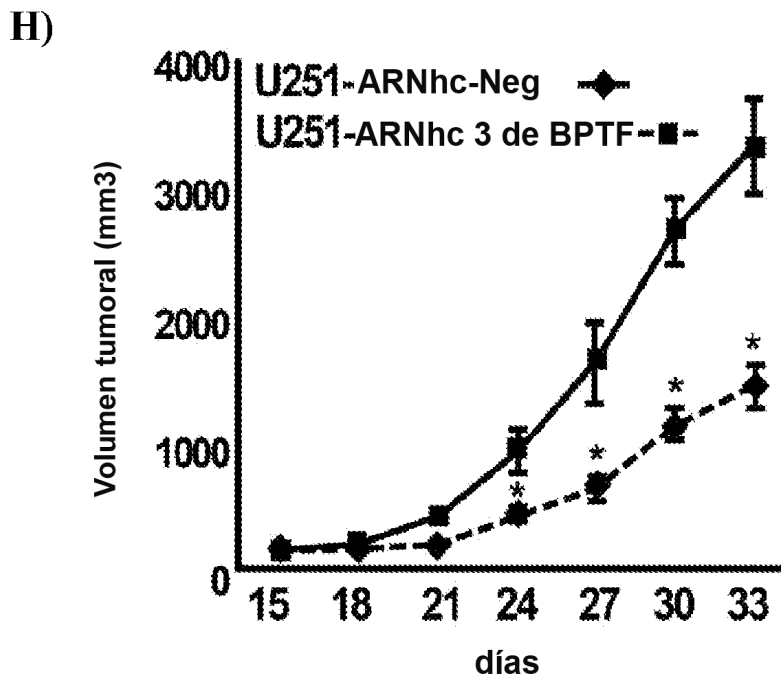
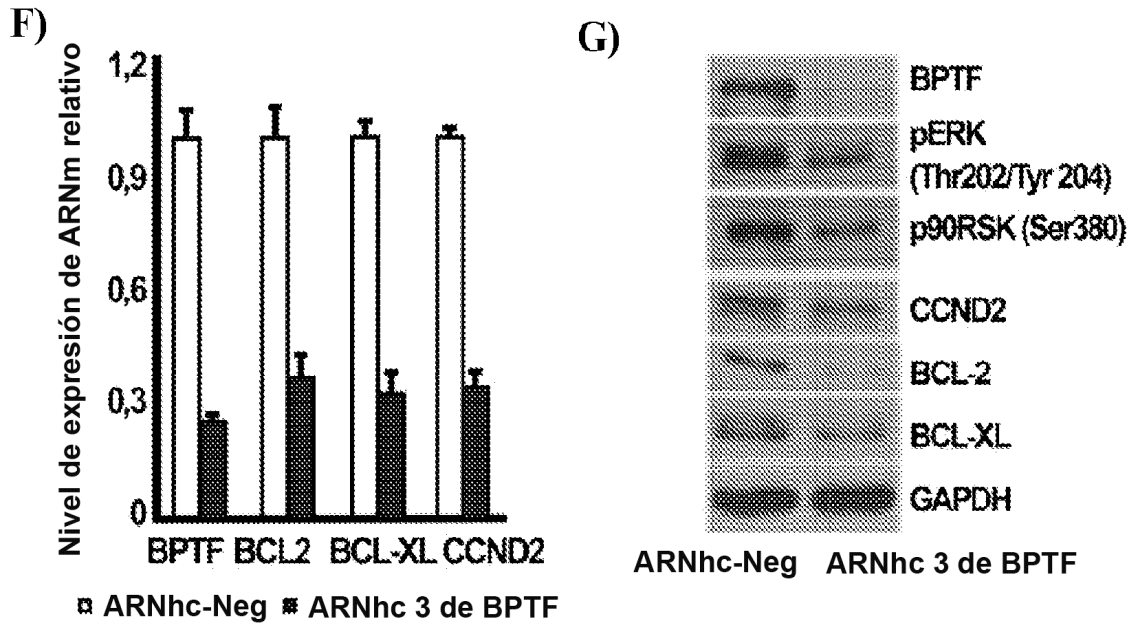


FIGURA 6F-H

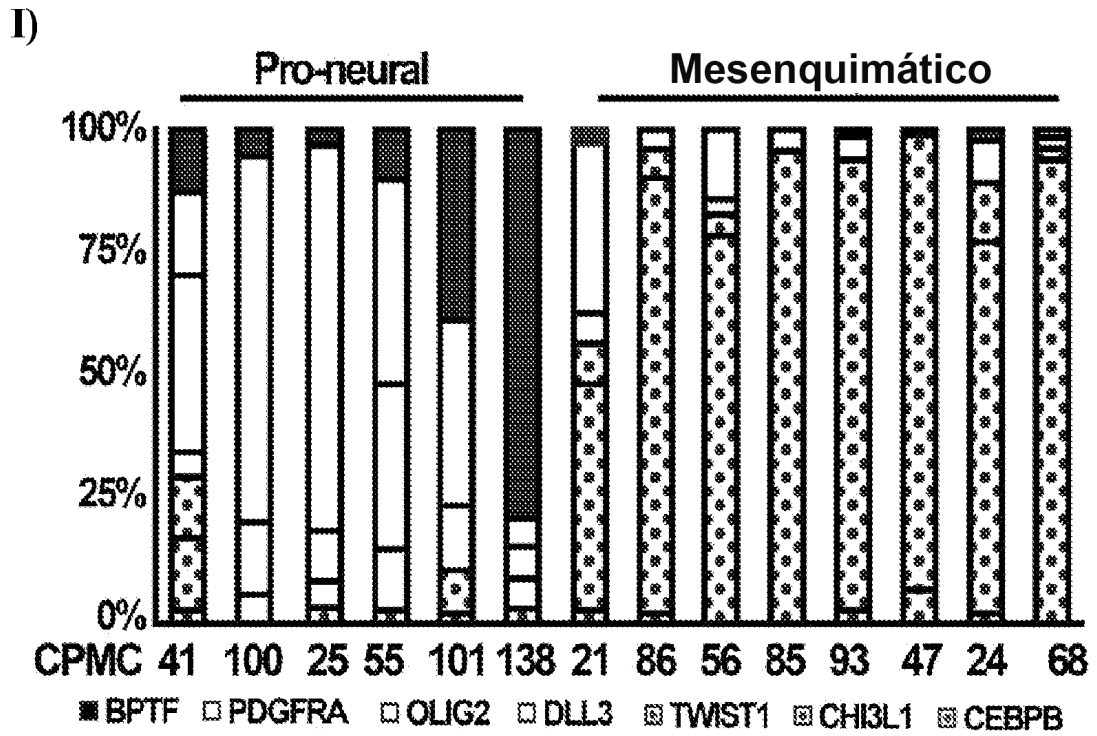


FIGURA 6I

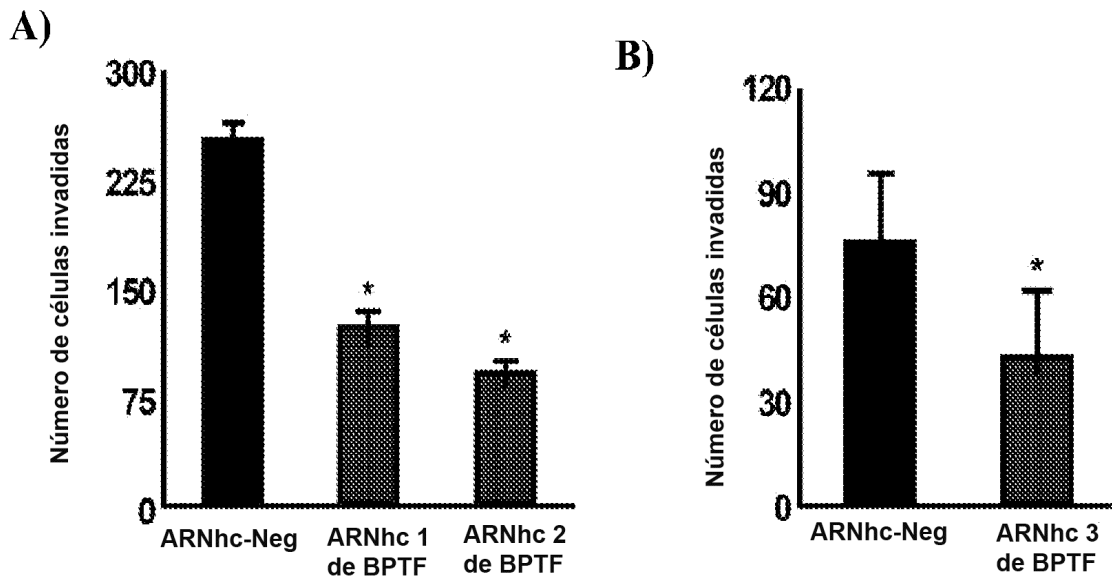


FIGURA 7A-B

C)

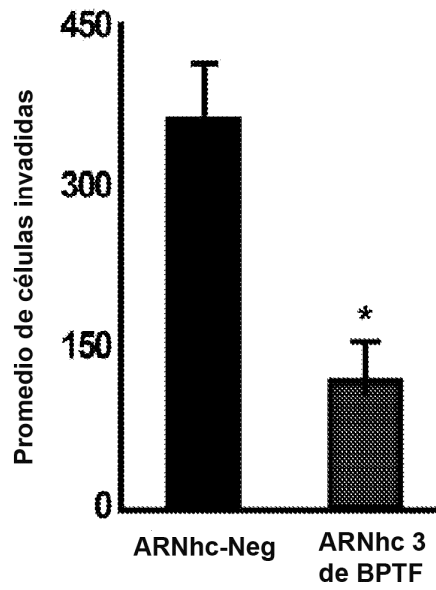
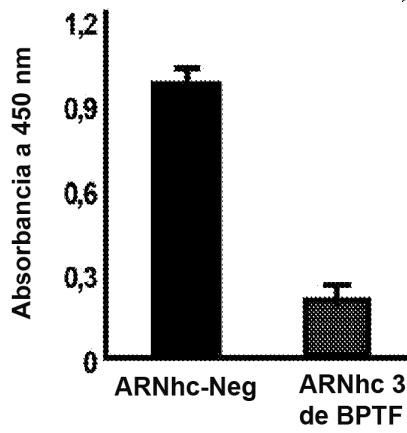


FIGURA 7C

A)



B)

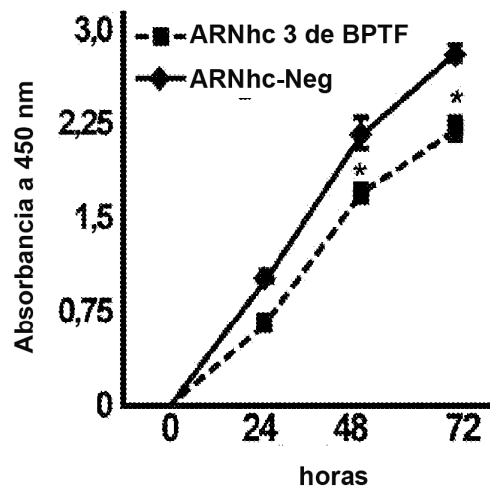


FIGURA 8A-B

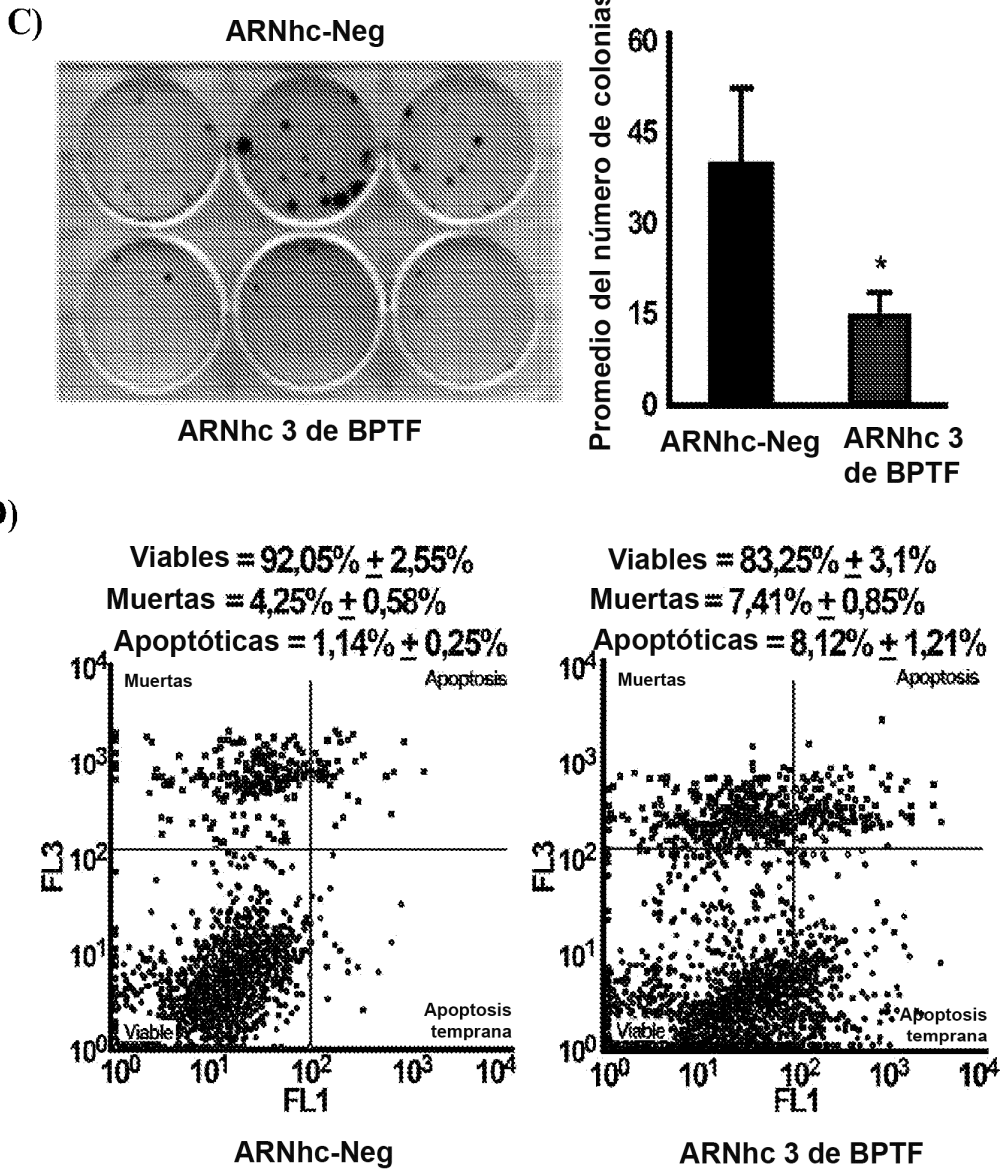


FIGURA 8C-D

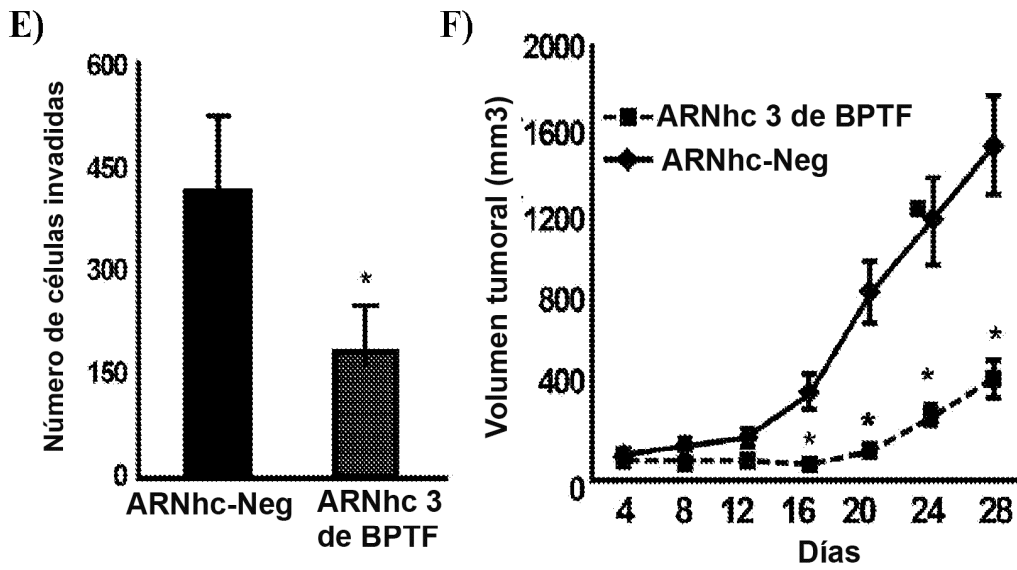


FIGURA 8E-F

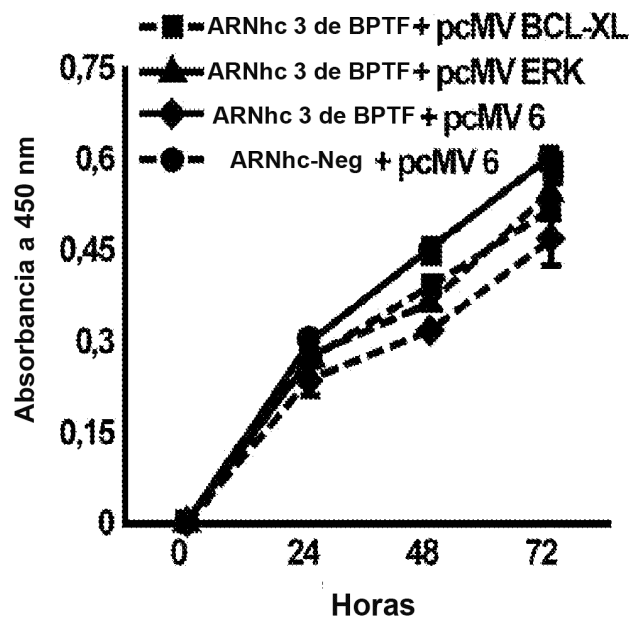


FIGURA 9

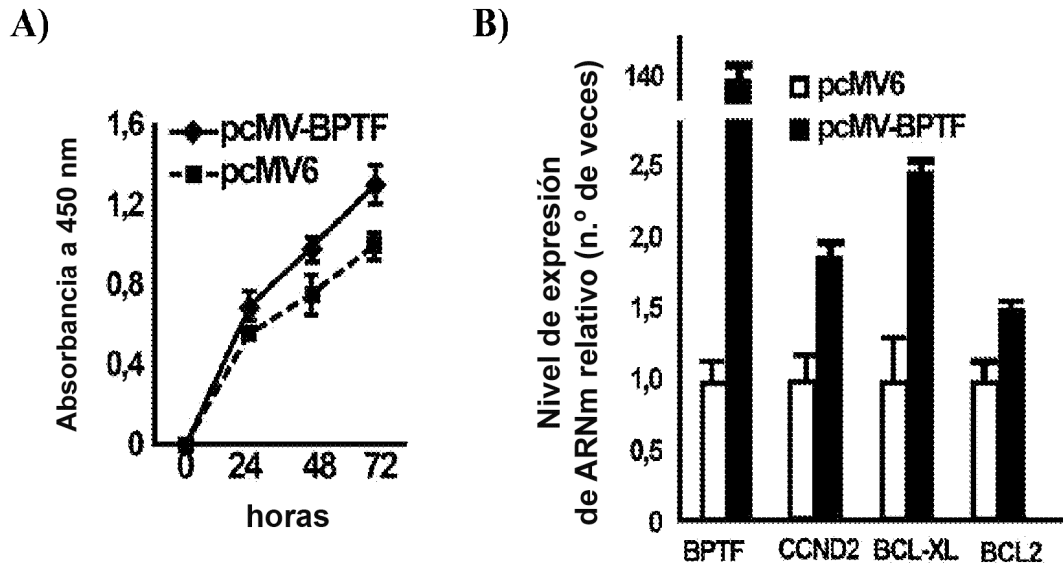


FIGURA 10A-B

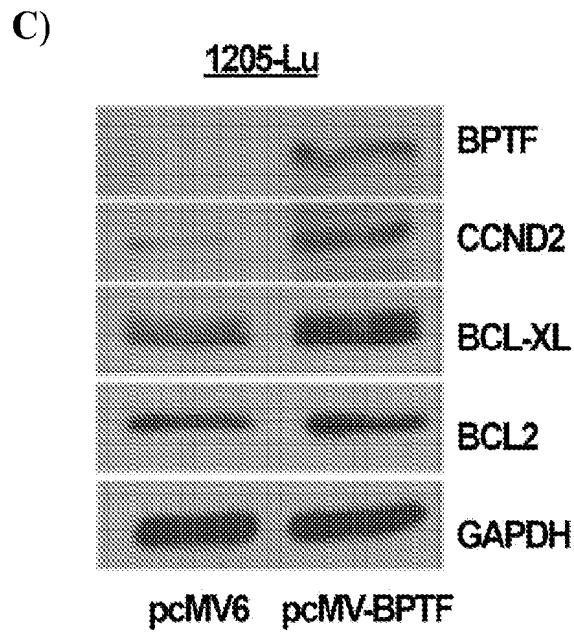


FIGURA 10C

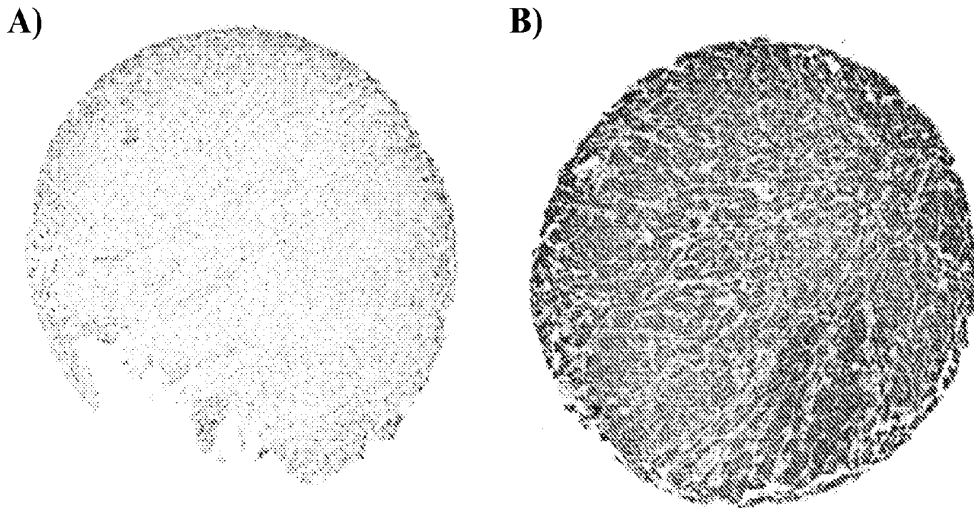


FIGURA 11A-B

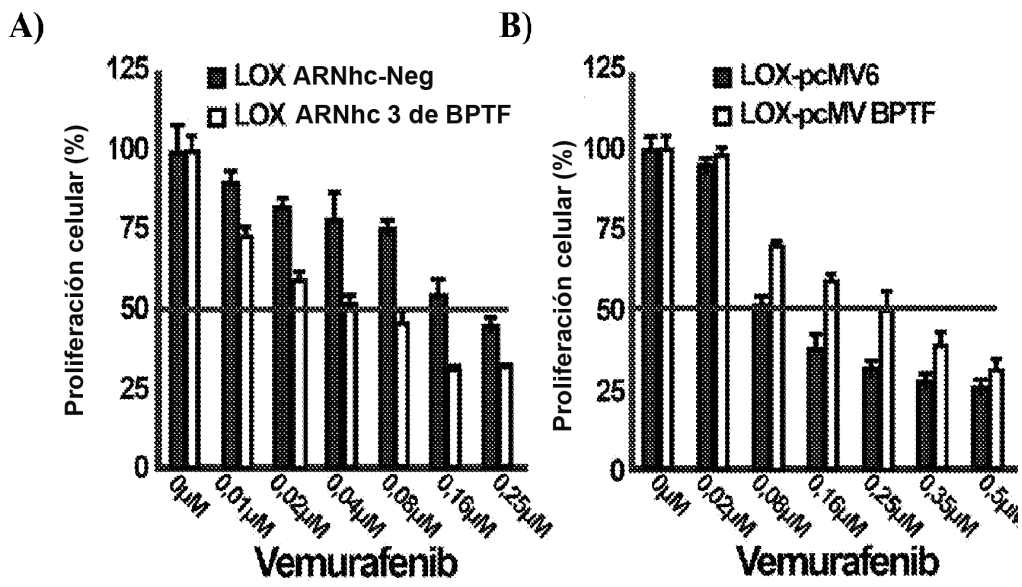


FIGURA 12A-B

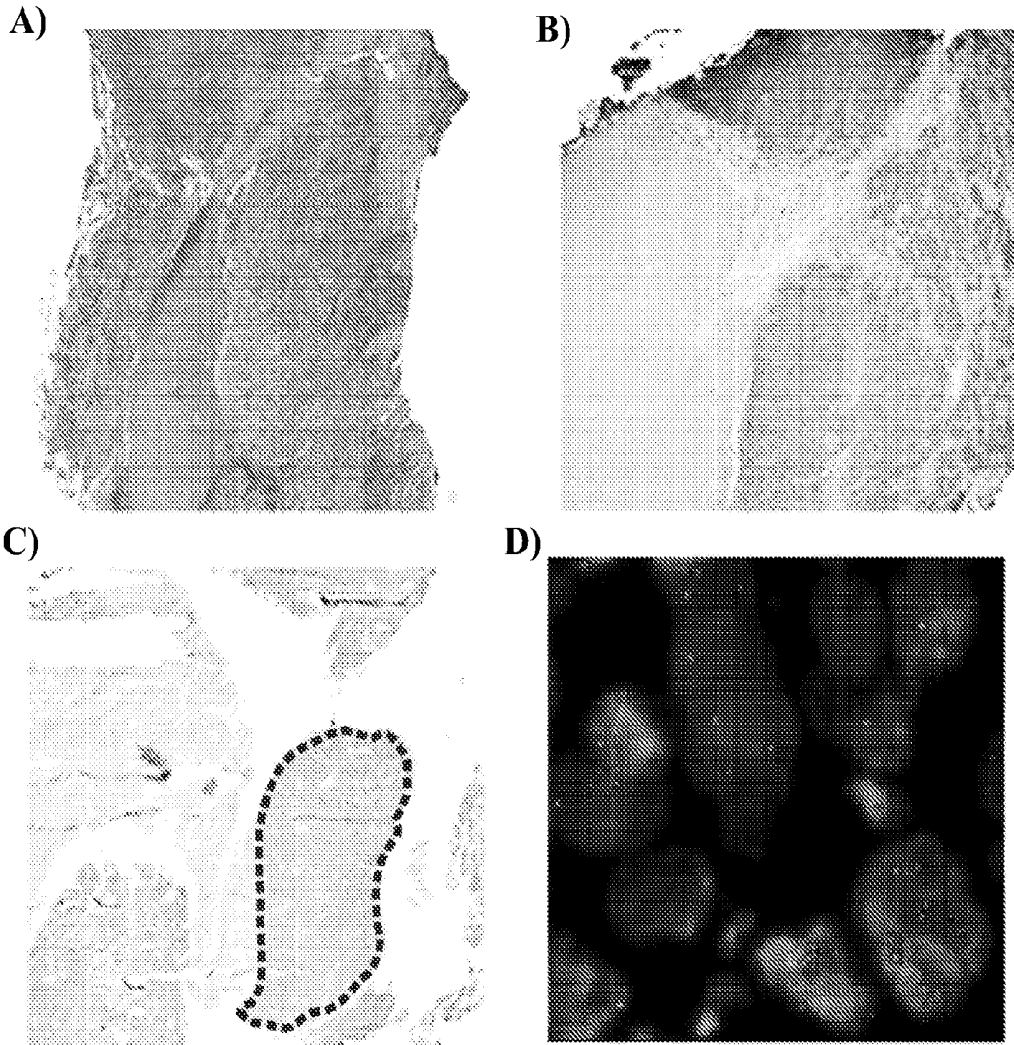


FIGURA 13A-D

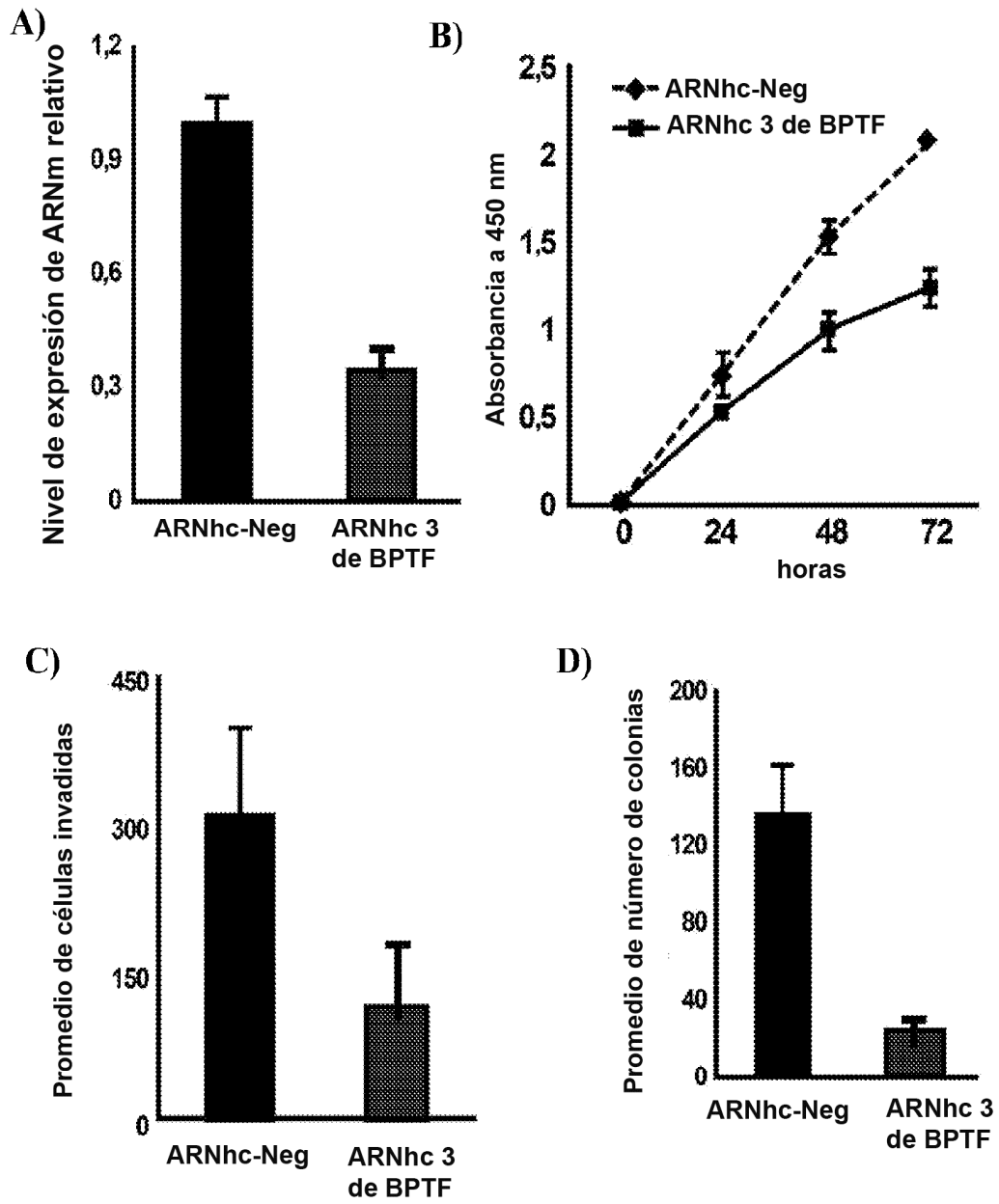


FIGURA 14A-D

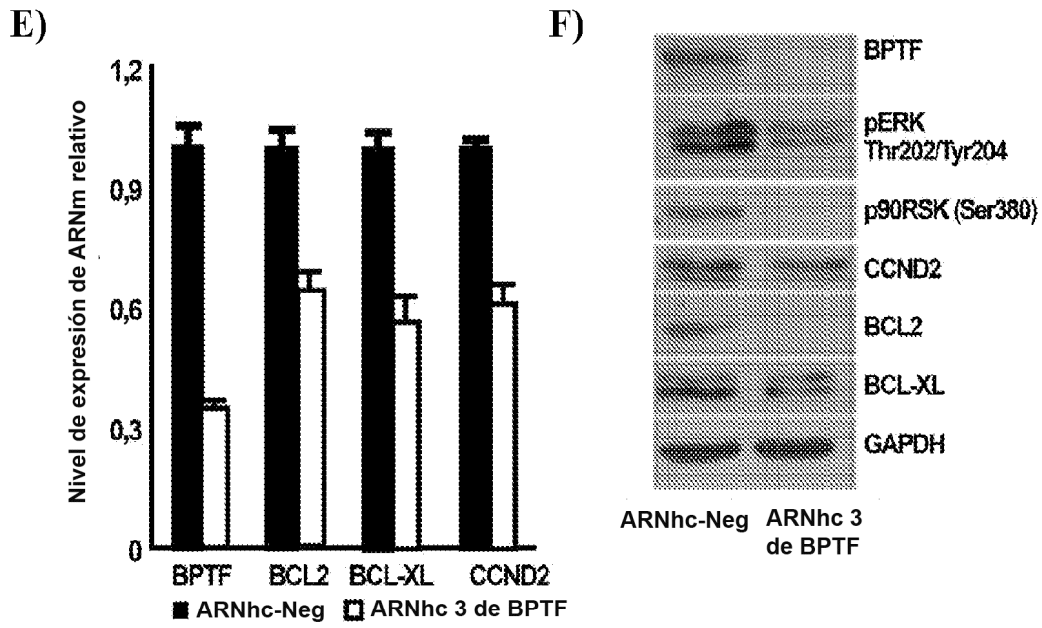


FIGURA 14E-F

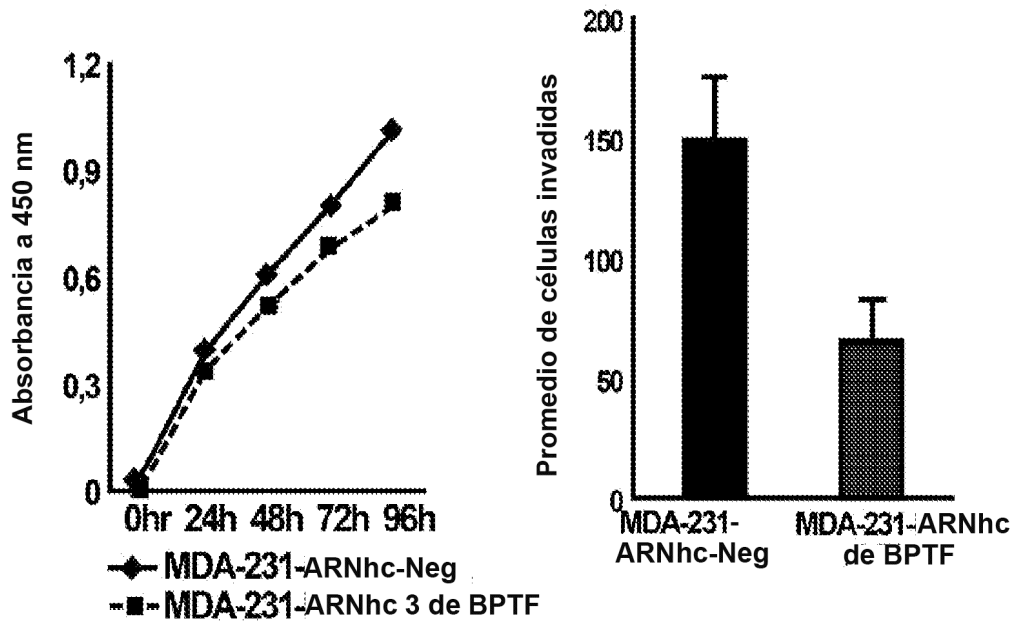


FIGURA 15

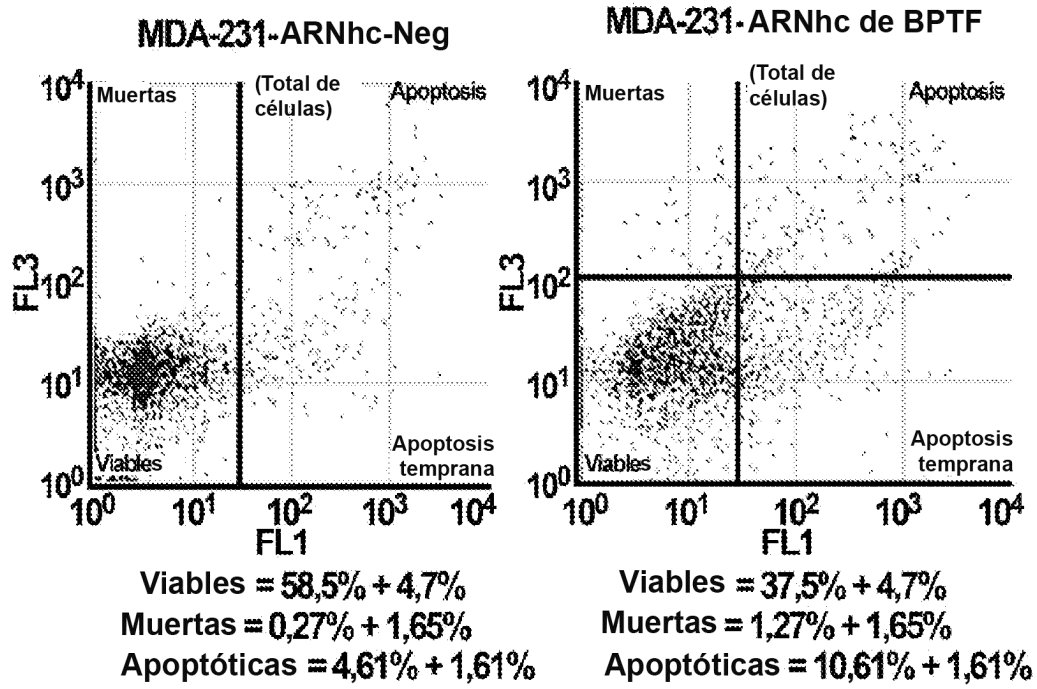
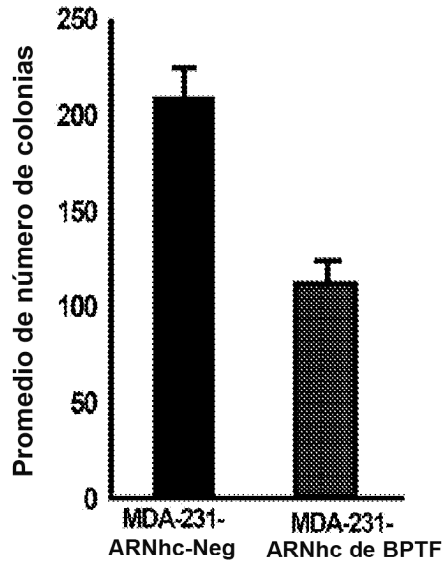


FIGURA 16

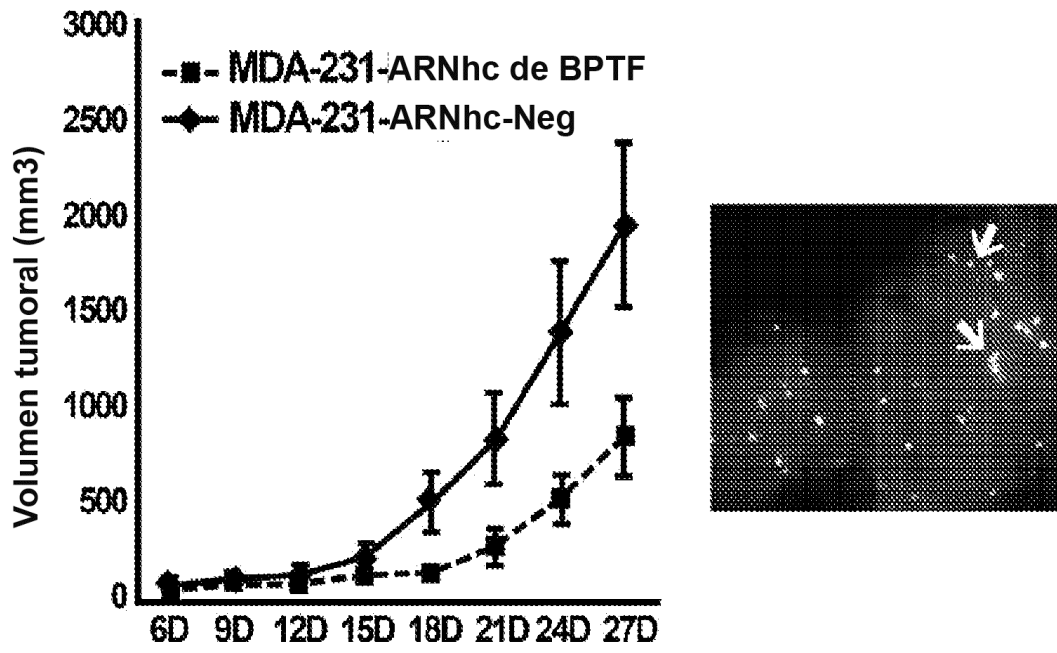


FIGURA 17