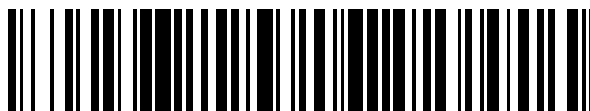


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 185**

51 Int. Cl.:

A61K 31/712	(2006.01) A61K 31/713	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) C07K 16/40	(2006.01)
A61P 17/08	(2006.01) C12N 15/113	(2010.01)
A61K 45/06	(2006.01) G01N 33/50	(2006.01)
A61K 31/352	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
A61K 31/353	(2006.01) A61K 31/4439	(2006.01)
A61K 31/4745	(2006.01) C12N 5/071	(2010.01)
A61K 31/475	(2006.01) A61K 31/437	(2006.01)
A61K 31/496	(2006.01)	
A61K 31/7076	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013** **PCT/US2013/038358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013** **WO13163512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013** **E 13780800 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 2841075**

54 Título: **Agentes y métodos para el tratamiento y prevención de queratosis seborreica**

30 Prioridad:

26.04.2012 US 201261638684 P

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

09.12.2020

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**MANDINOVA, ANNA I.;
LEE, SAM W. y
NEEL, VICTOR A.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 798 185 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

Agentes y métodos para el tratamiento y prevención de queratosis seborreica

Antecedentes de la invención

La piel humana está continuamente expuesta a una avalancha de estrés ambiental, el más importante de los cuales es la luz ultravioleta (UV)¹⁻³. La exposición crónica a la radiación UV conduce a una sobrecarga oxidativa y al daño irreparable del ADN de la célula, lo que da como resultado un metabolismo alterado y múltiples aberraciones genómicas en las células epidérmicas. Las consecuencias biológicas de estos procesos son el envejecimiento acelerado y benigno, así como la formación de tumores malignos⁴. Si bien es ampliamente aceptado que la transformación maligna es el resultado de la acumulación de alteraciones genómicas en oncogenes y genes supresores de tumores, se sabe mucho menos sobre la etología y los cambios genéticos en los tumores benignos.

En situaciones clínicas y experimentales, la mayoría de los tumores benignos no progresan a malignidad por razones poco conocidas. La piel proporciona un modelo intensamente estudiado de tejidos epiteliales autorrenovables, con distintas poblaciones de células madre que dan lugar a tumores con un comportamiento diferente. Entre estos, los carcinomas de células escamosas de la piel se encuentran entre los cánceres humanos más frecuentes. Además de los tumores malignos, las subpoblaciones de queratinocitos pueden dar lugar a tumores benignos de la piel como las queratosis seborreicas (SK). Estas son lesiones muy comunes que se desarrollan con la edad en la gran mayoría de la población humana. Las características histológicas comunes son acantosis, papilomatosis e hiperqueratosis junto con diversos grados de pigmentación. Las SK tienen similitudes clínicas con la verruga común. Si bien los virus del papiloma humano (VPH) han estado implicados en el origen de estas lesiones, los análisis recientes generalmente han descartado un papel para este virus en la mayoría de los casos. Los pacientes a menudo pueden tener múltiples SK, y se han descrito individuos que desarrollan una gran cantidad de estas lesiones (> 50) de forma familiar. Además, las SK parecen ser de origen clonal, lo que indica que no son el resultado de una hiperplasia epidérmica reactiva, sino de la expansión clonal de células somáticamente mutadas. De hecho, un trabajo reciente ha demostrado la presencia de mutaciones activadoras en un receptor de tirosina quinasa transmembrana específico, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos-3 (FGFR3) en una gran fracción de SK esporádicas. El hecho de que los ratones transgénicos con expresión específica de queratinocitos de una forma activada del receptor produzcan lesiones cutáneas histológicamente similares a SK sugiere un papel causal de las mutaciones de FGFR3.

Los documentos WO 2008/121261 A2 y WO 2005/094322 A2 describen el uso de triciribina (API-2), un inhibidor de Akt, en el tratamiento de la queratosis seborreica. El documento WO 2011/128701 A2 y E KH Han, et al.: "Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition", ONCOGENE, volumen 26, No. 38, páginas 5655-5661, describen el uso de los inhibidores de Akt, incluido A-443654, en medicina, aunque no en relación con el tratamiento de la queratosis seborreica.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición que comprende un inhibidor competitivo del ATP del Akt para usar en el tratamiento de la queratosis seborreica, en la que el inhibidor competitivo del ATP del Akt es A-443654 o GSK-690693.

La composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición puede aplicarse tópicamente o administrarse sistémicamente.

Los métodos y ensayos también se describen en este documento y se basan, en parte, en el descubrimiento de un nuevo método para aislar y cultivar células de queratosis seborreica *ex vivo*, una técnica que permite el estudio de estas células en cultivo. Antes de este descubrimiento, tales métodos para cultivar células de queratosis seborreica primaria no estaban disponibles en la técnica. También se describen en el presente documento ensayos de detección usando células de queratosis seborreica cultivadas y métodos para tratar la queratosis seborreica en un sujeto.

En este documento se describe un método para tratar una queratosis seborreica en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que inhibe la ruta de señalización de Akt a un sujeto que tiene una queratosis seborreica.

La composición puede aplicarse tópicamente o administrarse sistémicamente.

El método puede comprender además una etapa de diagnóstico del sujeto con una queratosis seborreica.

La cantidad terapéuticamente efectiva de la composición no afecta sustancialmente la supervivencia de los queratinocitos normales.

La composición puede comprender una molécula pequeña, un inhibidor peptídico o una molécula de ARNi.

La composición puede ser un inhibidor de Akt-1 y/o Akt-2 (por ejemplo, C8).

La composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento también se describe un método para inducir apoptosis en una célula de queratosis seborreica, comprendiendo el método poner en contacto una célula de queratosis seborreica con una cantidad eficaz de una composición que inhibe la señalización de Akt, induciendo así la apoptosis en la célula.

- 5 La cantidad efectiva de la composición no afecta sustancialmente la supervivencia de los queratinocitos normales.

La composición puede comprender una molécula pequeña, un inhibidor peptídico o una molécula de ARNi.

La composición puede ser un inhibidor de Akt-1 y/o un inhibidor de Akt-2 y/o un inhibidor de pan-Akt.

- 10 Se describe adicionalmente en el presente documento un método para cultivar células de queratosis seborreica *ex vivo*, que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células de queratosis seborreica obtenidas de un sujeto con una solución que comprende una enzima dispasa a una temperatura y durante un tiempo suficiente para iniciar la disociación de las células de queratosis seborreica de la muestra biológica, y (b) cultivar las células de queratosis seborreica disociadas.

- 15 El método puede comprender cultivar células de queratosis seborreica *ex vivo*, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células de queratosis seborreica obtenidas de un sujeto con una solución que comprende inicialmente una enzima dispasa y posteriormente una enzima tripsina a una temperatura y durante un tiempo suficiente para disociar las células de queratosis seborreica de la muestra biológica, y (b) cultivar las células de queratosis seborreica disociadas.

La temperatura puede estar por debajo de una temperatura ambiente estándar de 21 °C.

- 20 El tiempo suficiente para iniciar la digestión de las células de queratosis seborreica puede ser de al menos 15 horas.
El tiempo suficiente para iniciar la digestión de las células de queratosis seborreica con dispasa puede ser de al menos 15 horas.

El método puede comprender además una etapa de poner en contacto la muestra biológica que comprende células de queratosis seborreica con una proteasa adicional.

La proteasa adicional puede ser tripsina.

- 25 El método puede comprender además una etapa de añadir un medio de cultivo y filtrar partículas más grandes de las células disociadas antes del cultivo de la etapa (b).

Las células disociadas pueden cultivarse en placas recubiertas.

Se describe adicionalmente en el presente documento un ensayo de detección que comprende células de queratosis seborreica cultivadas obtenidas usando los métodos descritos en el presente documento.

- 30 Además, se describe un método para seleccionar un agente candidato para inducir apoptosis, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una célula de queratosis seborreica o población de células de queratosis seborreica con un agente candidato, y (b) medir la apoptosis en la célula o población de células, en el que un aumento en la apoptosis en la célula o población de células indica que el agente candidato induce la apoptosis.

El agente candidato puede comprender un inhibidor de la ruta de señalización de Akt.

- 35 La célula de queratosis seborreica o la población de células de queratosis seborreica se pueden cultivar usando el método descrito en el presente documento.

La apoptosis se puede medir usando el ensayo de sulforrodamina B (SRB), tinción con tetrazolio MTT, tinción con TUNEL, tinción con anexina V, tinción con yoduro de propidio, escalado de ADN, escisión con PARP, activación de caspasa y/o evaluación de la morfología celular y nuclear.

- 40 El agente candidato puede ser una molécula pequeña, un inhibidor de péptidos o una molécula de ARNi.

- 45 Se describe además un ensayo que comprende: (a) poner en contacto una población de células de queratosis seborreica disociadas con un agente candidato, (b) poner en contacto las células de la etapa (a) con un anticuerpo detectable específico para una proteína apoptótica, (c) medir la intensidad de la señal del anticuerpo detectable unido, (d) comparar la intensidad medida de la señal con un valor de referencia y si la intensidad medida aumenta en relación con el valor de referencia, (e) identificar al agente candidato como inductor de apoptosis en la célula.

El agente candidato puede comprender un inhibidor de la ruta de señalización de Akt (por ejemplo, un inhibidor de Akt-1 y/o Akt-2 y/o un inhibidor de pan-Akt).

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B muestran datos de cultivos primarios de células de queratosis seborreica (SK). (Figura 1A) Las lesiones se eliminaron mediante raspado y se colocaron en medio de crecimiento de queratinocitos (INVITROGEN); parte de las muestras se procesaron para aislamiento de ARN para secuenciación directa o para detección de niveles de ARNm de FOXN1 como se muestra en (Figura 1B). Los tejidos se disociaron físicamente primero, se incubaron con dispasa durante 24 horas y se tripsinizaron durante 3 minutos.

Las Figuras 2A-2C muestran datos relacionados con la detección de inductores de muerte celular de moléculas pequeñas en células primarias de SK. (Figura 2A) Se usaron 20 inhibidores de molécula pequeña (500 nM) de quinasas dentro de la ruta MAPK-Raf y PIK3/Akt para tratar células primarias de SK (en placas de 12 pozos) que albergan mutaciones FGFR3 o/y PIK3CA o ninguna. La muerte celular se detectó 24 horas después del tratamiento utilizando el ensayo SRB. (Figura 2B) Imágenes representativas de células después del tratamiento compuesto. (Figura 2C) Se usaron las mismas moléculas en queratinocitos humanos normales en dos concentraciones diferentes.

Las Figuras 3A-3C muestran datos relacionados con la inhibición mediada por moléculas pequeñas de la señalización de Akt en células primarias de SK. (Figura 3A) SK y queratinocitos normales se trataron con C8 durante 24 horas y se tiñeron con SRB. (Figura 3B) y (Figura 3C). Las células de SK se trataron con C8 durante 4 horas y se sometieron a transferencia Western para las proteínas correspondientes.

Las Figuras 4A-4D muestran datos relacionados con la inhibición de la señalización de Akt y la inducción de muerte celular en células primarias de SK. (Figura 4A) Las células de SK se trataron con dos inhibidores de Akt diferentes y la muerte celular se midió 24 horas después del tratamiento usando el ensayo de SRB. (Figura 4B) Los inhibidores de Akt se perfilaron contra el quinoma humano y se identificaron objetivos compartidos. (Figura 4C) Muerte celular en células de SK después de la inhibición de PKC. (Figura 4D) la muerte celular se midió en células de SK 72 horas después de la transfección con ARNi de control o ARNi para Akt1 y/o Akt2.

La Figura 5 muestra que el tratamiento tópico de los explantes de SK humanos induce la destrucción del tejido y la muerte celular. Los explantes de SK humanos se cultivaron en insertos de filtro en contacto con aire y se trataron tópicamente con DMSO o C8 1 mM durante 48 horas, la tinción con H&E (izquierda) y el etiquetado para la caspasa 3 activada indican la inducción de muerte celular en explantes tratados con compuesto.

Las Figuras 6A-6C muestran que la inhibición de Akt induce apoptosis en células de SK. (Figura 6A) Las células de SK se trataron con el inhibidor de Akt durante 24 horas para medir los niveles de PARP escindido por transferencia Western o (Figura 6B) durante 48 horas para detectar la tinción con TUNEL. (Figura 6C) 24 h después del tratamiento, los objetivos de Akt proapoptóticos fueron analizados por transferencia Western.

Las Figuras 7A-7C muestran que FoxO3 y p53 median la muerte celular en células de SK tras la inhibición de Akt. (Figura 7A) Las células se transfectaron con ARNpi de control o de FoxO3 o p53 y 48 horas después se trataron con C8. La muerte celular se midió 48 horas después del tratamiento usando el ensayo de SRB. Las imágenes de las células se muestran en (Figura 7B) y los niveles de proteína se analizaron por transferencia Western en (Figura 7C).

La Figura 8 muestra el perfil de muestras de SK humana: se extrajeron SK individuales y muestras de piel normal emparejadas mediante raspado de 10 pacientes diferentes y se sometieron a análisis de transferencia Western para determinar los niveles de Akt y p53 activados. Las flechas rojas indican un aumento de Akt fosforilado en S473 y las flechas azules muestran una disminución de los niveles de p53. Parte del tejido de SK se procesó para la secuenciación directa basada en PCR para mutaciones en FGFR3 y/o PIK3CA.

Las Figuras 9A-9B muestran la muerte celular en células primarias de SK tras la inhibición de Akt. (Figura 9A) Se correlaciona con la reducción de los niveles de fosfo GSK-3 β medidos por análisis de transferencia Western.

La Figura 10 muestra que la elipticina y kaempferol bloquean la señalización de Akt en las células de SK y también inducen la muerte celular en las células de SK en 48 horas.

La Figura 11 muestra que la piromicina es un inductor de la muerte celular en las células de SK.

La Figura 12 muestra que el activador de p53 Nutlin-3 induce la muerte celular en células de SK.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describen métodos y ensayos para aislar y cultivar células de queratosis seborreica *ex vivo*, una técnica que permite el estudio de estas células en cultivo. También se describen en el presente documento ensayos de detección usando células de queratosis seborreica cultivadas y métodos para tratar la queratosis seborreica en un sujeto.

Definiciones

Por conveniencia, en el presente documento se recopilan ciertos términos empleados en la solicitud completa (incluyendo la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas). A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente conoce el experto al cual pertenece esta invención.

En relación con el contacto de una célula con un inhibidor de la ruta de señalización de Akt, "inducir apoptosis" o "aumentar la muerte celular" en una célula indica que la muerte celular a través de la ruta apoptótica en una población de células es al menos un 5% mayor en poblaciones tratadas con un inhibidor de la ruta de señalización de Akt, que en una población de control comparable, en la que no está presente ningún inhibidor de la ruta de señalización de Akt.

Se prefiere que el porcentaje de muerte celular en una población tratada con inhibidor de la ruta de señalización de Akt sea al menos 10% más alto, al menos 20% más alto, al menos 30% más alto, al menos 40% más alto, al menos 50% más alto, al menos 60% más alto, al menos 70% más alto, al menos 80% más alto, al menos 90% más alto, al menos 1 vez más alto, al menos 2 veces más alto, al menos 5 veces más alto, al menos 10 veces más alto, al menos al menos 100 veces más alto, al menos 1000 veces más alto, o más que una población tratada de control de tamaño y condiciones de cultivo comparables. El término "población tratada de control" se usa en el presente documento para describir una población de células que se ha tratado con medios idénticos, inducción viral, secuencias de ácido nucleico, temperatura, confluencia, tamaño de matraz, pH, etc., con la excepción de la adición de el inhibidor de la ruta de señalización de Akt.

Por "apoptosis" se entiende una ruta de muerte celular en la que una célula moribunda muestra un conjunto de características bioquímicas bien caracterizadas que incluyen ampollas de membrana citodérmica, contracción del soma celular, condensación de cromatina, desintegración nuclear y escalado de ADN. Hay muchos ensayos bien conocidos para determinar el estado apoptótico de una célula, que incluyen, entre otros: reducción de tinción con tetrazolio MTT, tinción con TUNEL, tinción con anexina V, tinción con yoduro de propidio, escalado de ADN, escisión con PARP, activación de caspasa y evaluación de la morfología celular y nuclear. Cualquiera de estos u otros ensayos conocidos pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento para determinar si una célula está experimentando apoptosis.

Un "inhibidor" de la ruta de señalización de Akt, como se usa el término en el presente documento, puede funcionar de manera competitiva o no competitiva, y puede funcionar interfiriendo con la expresión de la proteína Akt (por ejemplo, Akt-1 y/o Akt-2) y/o una proteína secuencia abajo en la ruta de Akt (por ejemplo, FoxO3, GSK3, MDM2, etc.). Se puede tomar cualquiera de varios enfoques diferentes para inhibir la expresión o actividad de la proteína Akt. Un inhibidor de la ruta de Akt incluye cualquier entidad química o biológica que, tras el tratamiento de una célula, da como resultado la inhibición de la actividad biológica causada por la activación de Akt en respuesta a señales celulares. Los inhibidores de la ruta de Akt incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, intracuerpos, aptámeros, constructos antisentido, agentes de interferencia de ARN y ribozimas.

Como se usa en el presente documento, el término "agente candidato" se refiere a una composición prevista para reducir al menos un síntoma de una queratosis seborreica en al menos un 10%, por ejemplo, un agente candidato puede inhibir la señalización a través de la ruta de Akt o bien puede reducir el tamaño o la apariencia de un crecimiento de queratosis seborreica. Los agentes candidatos se pueden analizar utilizando los ensayos de detección descritos en el presente documento utilizando células de queratosis seborreica primaria para determinar si el agente candidato puede causar de forma reproducible un resultado deseado y, por lo tanto, ser útil como un inhibidor de la ruta de señalización de Akt o un tratamiento para las queratosis seborreicas en un sujeto.

Un "ácido nucleico", como se describe en el presente documento, puede ser ARN o ADN, y puede ser monocatenario o bicatenario, y puede seleccionarse, por ejemplo, de un grupo que incluye: ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, análogos de ácido nucleico, por ejemplo, ácido péptido-nucleico (PNA), PNA pseudo complementario (pc-PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), etc. Tales secuencias de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, por ejemplo, que actúan como represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, pequeñas secuencias inhibidoras de ácido nucleico, por ejemplo, pero no se limitan a ARNi, ARNi pequeño de horquilla, ARN pequeño de interferencia (ARNpi), micro ARNi (mARNi), oligonucleótidos antisentido, etc.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad que es segura y suficiente para tratar, enseñar la aparición o retrasar el desarrollo de una queratosis seborreica. La cantidad puede curar o mejorar los síntomas de la queratosis seborreica, retrasar el curso del crecimiento o la progresión de la queratosis seborreica y/o retrasar o inhibir un síntoma de una queratosis seborreica. La cantidad efectiva para el tratamiento de la queratosis seborreica depende del tipo de queratosis seborreica a tratar, la gravedad de los síntomas, el sujeto a tratar, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración, etc. Por lo tanto, no es posible ni prudente especificar una "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, un experto en la técnica puede determinar una "cantidad efectiva" apropiada usando solo experimentación de rutina.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento incluye un ser humano, ratón, rata, conejillo de indias, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, mono, chimpancé, babuino o rhesus. En un ejemplo, el sujeto es un mamífero. En otro ejemplo, el sujeto es un ser humano.

El término "mamífero" pretende abarcar un "mamífero" singular y "mamíferos" plural, e incluye, pero no se limita a humanos; primates como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos como perros y lobos; felinos como gatos, leones y tigres; équidos como caballos, burros y cebras; animales de alimentación como vacas, cerdos y ovejas; ungulados como ciervos y jirafas; roedores como ratones, ratas, hamsters y conejillos de indias; y osos. En algunos ejemplos preferidos, un mamífero es un humano.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ácido nucleico. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ácido nucleico en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, por lo tanto, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes", o más simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más utilizada. Sin embargo, se pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, replicación defectuosa de retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociados), que cumplen funciones equivalentes. Los lentivirus se pueden usar para administrar una o más moléculas de ARNpi a una célula.

Dentro de un vector de expresión, "unido operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la secuencia o secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula objetivo cuando el vector se introduce en la célula objetivo). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros, elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Además, los agentes de interferencia de ARN pueden administrarse mediante un vector que comprende una secuencia reguladora para dirigir la síntesis de los ARNpi a intervalos específicos, o durante un período de tiempo específico. Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula objetivo, el nivel de expresión del ARNpi deseado y similares.

Los vectores de expresión pueden introducirse en células objetivo para producir de ese modo moléculas de ARNpi. Una plantilla de ADN, por ejemplo, una plantilla de ADN que codifica la molécula de ARNpi dirigida contra el alelo mutante, puede ligarse en un vector de expresión bajo el control de la ARN polimerasa III (Pol III) y suministrarse a una célula objetivo. Pol III dirige la síntesis de pequeñas transcripciones no codificantes cuyos extremos 3' se definen por terminación dentro de un tramo de 4-5 timidinas. En consecuencia, las plantillas de ADN se pueden usar para sintetizar, *in vivo*, tanto cadenas sentido como antisentido de ARNpi que afectan al ARNi (Sui, et al., (2002) PNAS 99 (8): 5515).

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias al "método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer esta divulgación, etc. Se entiende que la descripción detallada anterior y los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no deben tomarse como limitaciones sobre el alcance de la invención. Se pueden hacer varios cambios y modificaciones a las realizaciones descritas, que serán evidentes para los expertos en la materia, sin apartarse de la presente invención. Las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones identificadas se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una invención previa o por cualquier otro motivo. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

Diagnóstico de queratosis seborreica

Las queratosis seborreicas (SK) son los tumores epiteliales benignos más comunes en humanos. Se desconoce la etiología de las SK, pero muestran evidencia histológica de una mayor proliferación de queratinocitos. Estas lesiones tienen una mayor tasa de apoptosis y varios estudios muestran que su incidencia aumenta con la edad. Algunos estudios han encontrado que el 88% de las personas mayores de 64 años tienen al menos una SK.

Las SK se caracterizan como una mácula hiperqueratótica opaca que evoluciona a una lesión papulonodular. Pueden aparecer de color marrón pálido, rosa, café claro o marrón y la superficie puede volverse áspera o verrugosa. El tamaño varía de 5 mm a varios centímetros y se observa un aspecto clásico "pegado". Las SK nunca progresan a tumores malignos.

Las SK albergan comúnmente mutaciones oncogénicas múltiples en los oncogenes FGFR3, PIK3CA, KRAS, HRAS, EGFR y AKT1, pero no en los genes supresores de tumores p53, TSC1 y PTEN. No hay evidencia que indique que se active un programa de senescencia en las SK. El perfil de expresión de las SK es muy similar a los tumores malignos

de la piel, tales como los carcinomas de células escamosas, con la excepción de que las SK albergan una fuerte activación de un programa de pro diferenciación gobernado por un circuito de retroalimentación entre la señalización activada del receptor de tirosina quinasa (tal como FGFR3) y el factor de transcripción FOXN1.

Las queratosis seborreicas pueden ser fácilmente diagnosticadas visualmente por un experto en medicina, particularmente en dermatología. Una queratosis seborreica es típicamente un crecimiento marrón, negro o pálido que se encuentra en la espalda, los hombros, la cara o el pecho. En general, una queratosis seborreica está ligeramente elevada por encima de la superficie de la piel y puede parecer cerosa o escamosa. En algunos casos, una queratosis seborreica puede parecerse a una verruga, una queratosis actínica o un cáncer de piel. Si un médico sospecha que hay cáncer de piel, se puede realizar una biopsia para confirmar que un crecimiento es una queratosis seborreica. Tales métodos son rutinarios para los expertos en la materia.

Queratosis seborreica y señalización de Akt

Las mutaciones detectadas en SK se observan en tumores malignos y, lo que es más importante, cuando se expresan en células o animales transgénicos son suficientes para inducir la transformación y causar cáncer. De manera similar, el intento de los inventores de identificar determinantes moleculares importantes y específicos de SK dio como resultado la detección de una mayor expresión de factores de crecimiento y otros genes que se cree que están involucrados en la formación de tumores epiteliales o la diferenciación de queratinocitos⁸. La observación de que las SK rara vez, si es que alguna vez, se vuelvan malignas es desconcertante. Una situación análoga pero significativamente diferente ocurre en los nevos melanocíticos benignos, que a menudo tienen mutaciones activadoras en la molécula de señalización b-Raf, la misma mutación que se observa en muchos melanomas malignos⁹. Sin embargo, los nevos melanocíticos todavía tienen un riesgo de transformación maligna. Por lo tanto, las SK representan una oportunidad única para estudiar las aberraciones genómicas que se toleran en los tumores benignos e investigar cómo funcionan las señales moleculares impulsadas por los oncogenes en células no transformadas.

Los genes mutados con mayor frecuencia en SK son FGFR3 y la subunidad p110α de PI3K (PIK3CA), en la que las mutaciones de puntos calientes producen activación constitutiva y señalización a través de la ruta PI3K-Akt⁷. A nivel molecular, la señalización de PI3K secuencia arriba de la activación de Akt (una serina-treonina quinasa secuencia abajo de PI3K, también conocida como PKB), está regulada negativamente por el supresor tumoral PTEN¹⁰. La señalización activada de Akt es crítica para promover la supervivencia celular secuencia abajo de factores de crecimiento, oncogenes y estrés celular¹¹. Akt mejora la supervivencia de las células al bloquear la función de las rutas pro-apoptóticas, tales como las rutas p53-MDM2, así como la cascada pro-apoptótica mediada por FOXO¹².

Akt es una proteína serina-treonina quinasa que está regulada por el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) y se ha implicado en la señalización de la supervivencia en una amplia variedad de células, incluidas las células fibroblásticas, epiteliales y neuronales (Franke et al., Cell 1997; 1; 88: 435-7; Hemmings et al., Science 1997; 275: 628-30). Akt fue reconocido por primera vez como un factor antiapoptótico durante el análisis de la señalización por el factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1), que promueve la supervivencia de las neuronas cerebelosas (Dudek et al., Science 1997; 275: 661-5). Se demostró que IGF-1 activa la activación desencadenada por la PI3-quinasa de la serina-treonina quinasa, Akt.

La definición adicional y los detalles de la ruta de señalización de PI3 quinasa/Akt se describen en la técnica, por ejemplo, Downward, J. Curr. Opin. Cell Biol. 10, 262-267 (1988); Jimenez, C. et al., J. Biol. Chem 277 (44): 41556-41562 (2002); Kitamura, T. et al., Mol. Cell Biol. 19, 6286-6296 (1999); Ruggero D. y Sonenberg N. Oncogene. 24, 7426-34 (2005); Testa J. R. y Tsichlis P. N. Oncogene. 7391-7393 (2005); y Zhou X. M. et al., J. Biol. Chem 275, 25046-25051 (2000).

Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo para la muerte celular programada que ocurre típicamente durante la embriogénesis, el desarrollo y durante la respuesta fisiológica normal al envejecimiento. La apoptosis también puede desencadenarse en respuesta a un factor estresante celular, tal como el calor, la radiación, la privación de nutrientes, la infección viral, la hipoxia, el aumento de la concentración de calcio intracelular y en respuesta a la activación de ciertos receptores de glucocorticoides. La apoptosis, en parte, inicia la activación de una o más rutas de señalización de caspasas. Las caspasas son proteasas fuertes que se escinden después de los residuos de ácido aspártico y, una vez activadas, son responsables de la escisión proteolítica de un amplio espectro de objetivos celulares que finalmente conducen a la muerte celular. La regulación defectuosa de la apoptosis puede conducir a una variedad de trastornos. Por ejemplo, la actividad apoptótica deteriorada puede conducir a una supervivencia celular inapropiada, y está asociada con crecimiento tumoral, cáncer, enfermedad autoinmune y enfermedad inflamatoria. Por el contrario, los niveles patológicamente altos de apoptosis pueden provocar el inicio anormal de las rutas de muerte celular, como se observa en, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, demencia e isquemia cerebral, entre otras) e infección (por ejemplo, SIDA).

Las proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis incluyen, por ejemplo, caspasa-3, caspasa-6, caspasa-9 y PARP, entre otras. Dichas proteínas se pueden usar en inmunoensayos para detectar apoptosis en una célula o tejido.

Otros ejemplos de ensayos para determinar la presencia y/o el nivel de apoptosis en una muestra incluyen, pero no

se limitan a, la apoptosis que se mide usando el ensayo de sulforrodamina B (SRB), tinción con tetrazolio MTT, tinción con TUNEL, tinción con anexina V, Tinción con yoduro de propidio, escalado de ADN, escisión con PARP, activación de caspasa y/o evaluación de la morfología celular y nuclear.

Inhibición de Akt

- 5 Por "inhibe la expresión de Akt-1 y/o Akt-2" se entiende que la cantidad de expresión de Akt-1 y/o Akt-2 es al menos 5% menor en poblaciones tratadas con un inhibidor de la ruta de señalización de Akt, que una población comparable de control, en la que no está presente tal inhibidor. Se prefiere que el porcentaje de expresión de Akt (por ejemplo, Akt-1 y/o Akt-2) en una población tratada con inhibidor sea al menos un 10% más bajo, al menos un 20% más bajo, al menos un 30% más bajo, al menos un 40% más bajo, al menos un 50% más bajo, al menos un 60% más bajo, al menos un 70% más bajo, al menos un 80% más bajo, al menos un 90% más bajo, al menos 1 vez más bajo, al menos 2 veces más bajo, al menos 5 veces más bajo, al menos 10 veces más bajo, al menos 100 veces más bajo, al menos 1000 veces más bajo, o más de una población tratada de control comparable en la que no se agrega inhibidor.

- 15 Por "inhibe la actividad de Akt" se entiende que la cantidad de actividad funcional de Akt-1 y/o Akt-2 es al menos un 5% menor en poblaciones tratadas con un inhibidor de Akt o de la ruta de señalización de Akt, que una población de control comparable, en la que no está presente tal inhibidor. Se prefiere que el porcentaje de actividad de Akt (por ejemplo, actividad de Akt-1 y/o Akt-2) en una población tratada con inhibidor sea al menos un 10% más bajo, al menos un 20% más bajo, al menos un 30% más bajo, al menos 40 % más bajo, al menos 50% más bajo, al menos 60% más bajo, al menos 70% más bajo, al menos 80% más bajo, al menos 90% más bajo, al menos 1 vez más bajo, al menos 2 veces más bajo, al menos 5 más bajo, al menos 10 veces más bajo, al menos 100 veces más bajo, al menos 1000 veces más bajo, o más de una población comparable tratada con control en la que no se agrega inhibidor de Akt o de la ruta de señalización de Akt. Como mínimo, la actividad de Akt puede analizarse determinando la cantidad de expresión de Akt a niveles de proteína o ARNm, usando técnicas estándar en el arte. Alternativamente, o además, la actividad de Akt puede determinarse usando un constructo informador, en el que el constructo informador es sensible a la actividad Akt.

- 25 Como se describe en el presente documento, el inhibidor de la actividad de Akt puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo contra Akt-1 y/o Akt-2 (incluido un anticuerpo que actúa como un inhibidor de pan-Akt) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula pequeña y un ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser un agente de interferencia de ARN específico de Akt-1 y/o Akt-2, un vector que codifica el agente de interferencia de ARN o un aptámero que une Akt-1 y/o Akt-2.
- 30 El inhibidor de la actividad de Akt puede interferir con las interacciones de Akt con sus mediadores secuencia abajo. Los mediadores secuencia abajo pueden ser GSK3, FoxO3, MDM2, entre otros.

Inhibidores de anticuerpos de la ruta de señalización de Akt

- 35 Los anticuerpos que se unen específicamente a Akt o un mediador secuencia abajo de Akt pueden usarse para inhibir la ruta de señalización de Akt *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Los anticuerpos contra Akt están disponibles comercialmente y/o pueden ser generados por un experto en la técnica utilizando métodos bien conocidos. La actividad inhibidora de Akt de un anticuerpo dado, o, en cualquier caso, cualquier inhibidor de Akt, puede evaluarse utilizando métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento, para evitar dudas, un anticuerpo que inhibe Akt causará un aumento en la muerte celular. Los inhibidores de anticuerpos de Akt pueden incluir anticuerpos policlonales y monoclonales y derivados de unión a antígeno o fragmentos de los mismos. Los fragmentos de unión a antígeno bien conocidos incluyen, por ejemplo, anticuerpos de dominio único (dAb; que consisten esencialmente en dominios de anticuerpos VL o VH únicos), fragmento Fv, incluido el fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), fragmento Fab y fragmento F(ab')₂. Los métodos para la construcción de tales moléculas de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

- 45 Un "anticuerpo" que puede usarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluye inmunoglobulinas completas, fragmentos de inmunoglobulinas de unión a antígeno, así como proteínas de unión a antígeno que comprenden dominios de inmunoglobulina de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno de inmunoglobulinas incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv y dAb. Se han desarrollado formatos de anticuerpos modificados que retienen la especificidad de unión, pero tienen otras características que pueden ser deseables, que incluyen, por ejemplo, biespecificidad, multivalencia (más de dos sitios de unión) y tamaño compacto (por ejemplo, dominios de unión solos). Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de algunos o de todos los dominios constantes de los anticuerpos completos de los que derivan. Por lo tanto, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos completos. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienden a estar libres de ciertas interacciones no deseadas entre regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Además, los anticuerpos monocatenarios son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden tener una mayor permeabilidad que los anticuerpos completos, lo que permite que los anticuerpos monocatenarios se localicen y se unan a los sitios de unión al antígeno más eficientemente. Además, el tamaño relativamente pequeño de los anticuerpos de cadena sencilla los hace menos propensos a provocar una respuesta inmune no deseada en un receptor que los anticuerpos completos. Múltiples anticuerpos de cadena sencilla, cada cadena individual que tiene un dominio VH y un VL unidos covalentemente por un primer enlazador peptídico, pueden estar unidos covalentemente

por al menos uno o más enlaces peptídicos para formar anticuerpos multivalentes de cadena sencilla, que pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos. Cada cadena de un anticuerpo multivalente de cadena sencilla incluye un fragmento de cadena ligera variable y un fragmento de cadena pesada variable, y está unida por un enlazador peptídico a al menos otra cadena. El enlazador peptídico está compuesto de al menos quince residuos de aminoácidos.

El número máximo de residuos de aminoácidos del enlazador es aproximadamente cien. Se pueden combinar dos anticuerpos de cadena sencilla para formar un diacuerpo, también conocido como dímero bivalente. Los diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de unión, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio VH conectado a un dominio VL. Los dominios están conectados con enlazadores que son lo suficientemente cortos como para evitar el emparejamiento entre dominios en la misma cadena, lo que impulsa el emparejamiento entre dominios complementarios en diferentes cadenas para recrear los dos sitios de unión a antígeno. Se pueden combinar tres anticuerpos de cadena sencilla para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos se construyen con el terminal de aminoácidos de un dominio VL o VH directamente fusionado con el terminal carboxilo de un dominio VL o VH, es decir, sin ninguna secuencia enlazadora. El triacuerpo tiene tres cabezas Fv con los polipéptidos dispuestos de forma cíclica, de la cabeza a la cola. Una posible conformación del triacuerpo es plana con los tres sitios de unión ubicados en un plano en un ángulo de 120 grados entre sí. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o triespecíficos. Por lo tanto, los anticuerpos útiles en los métodos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, anticuerpos naturales, fragmentos bivalentes tales como (Fab')₂, fragmentos monovalentes tales como Fab, anticuerpos de cadena sencilla, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos multivalentes de cadena sencilla, diacuerpos, triacuerpos y similares que se unen específicamente con un antígeno.

Los anticuerpos también pueden generarse contra un polipéptido o una porción de un polipéptido mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos se generan fácilmente en animales tales como conejos o ratones mediante inmunización con el producto génico, o un fragmento del mismo. Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proporcionar fuentes de células B para la fabricación de hibridomas, que a su vez se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales. Los métodos de fabricación de anticuerpos se describen en detalle, por ejemplo, en Harlow et al., 1988. Si bien pueden usarse anticuerpos policlonales y monoclonales en los métodos descritos en el presente documento, se prefiere que se use un anticuerpo monoclonal cuando las condiciones requieren una mayor especificidad por una proteína particular.

Inhibidores de ácidos nucleicos de la expresión de Akt

Un enfoque poderoso para inhibir la expresión de polipéptidos objetivo seleccionados es mediante el uso de agentes de interferencia de ARN. El ARN de interferencia (ARNi) utiliza dúplex de ARN pequeños de interferencia (ARNpi) que se dirigen al ARN mensajero que codifica el polipéptido objetivo para la degradación selectiva. El silenciamiento postranscripcional de la expresión génica dependiente de ARNpi implica la escisión de la molécula de ARN mensajero objetivo en un sitio guiado por el ARNpi. El "ARN de interferencia (ARNi)" es un proceso conservado evolutivamente mediante el cual la expresión o introducción de ARN de una secuencia que es idéntica o muy similar a un gen objetivo da como resultado la degradación específica de secuencia o el silenciamiento genético postranscripcional específico (PTGS) del ARN mensajero (ARNm) transcrito a partir de ese gen objetivo (véase Coburn, G. y Cullen, B. (2002) J. of Virology 76 (18): 9225), inhibiendo así la expresión del gen objetivo. El ARN puede ser ARN bicatenario (ARNbc). Este proceso se ha descrito en células de plantas, invertebrados y mamíferos. En la naturaleza, el ARNi es iniciado por la endonucleasa Dicer específica de ARNbc, que promueve la escisión progresiva del ARNbc largo en fragmentos bicatenarios denominados ARNpi. Los ARNpi se incorporan a un complejo proteico (denominado "complejo silenciador inducido por ARN" o "RISC") que reconoce y escinde los ARNm objetivo. El ARNi también puede iniciarse mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ARNpi sintéticos o agentes de interferencia de ARN, para inhibir o silenciar la expresión de genes objetivo. Como se usa en el presente documento, "inhibición de la expresión del gen objetivo" incluye cualquier disminución en la expresión o actividad de proteína o nivel del gen o proteína objetivo codificada por el gen objetivo en comparación con una situación en la que no se ha inducido ARN de interferencia. La disminución será de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% o más en comparación con la expresión de un gen objetivo o la actividad o el nivel de la proteína codificada por un gen objetivo que no ha sido dirigido por un agente de interferencia de ARN.

Los términos "agente de interferencia de ARN" y "ARN de interferencia" tal como se usan en el presente documento pretenden abarcar esas formas de silenciamiento génico mediadas por ARN bicatenario, independientemente de si el agente de interferencia de ARN comprende un ARNpi, miARN, ARNph u otra molécula de ARN bicatenario. "ARN de interferencia corto" (ARNpi), también denominado en el presente documento "ARN pequeño de interferencia" se define como un agente de ARN que funciona para inhibir la expresión de un gen objetivo, por ejemplo, mediante ARNi. Un ARNpi puede sintetizarse químicamente, puede producirse por transcripción *in vitro* o puede producirse dentro de una célula huésped. El ARNpi puede ser una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 28 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente de aproximadamente 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos de longitud, y pueden contener un saliente 3' y/o 5' en cada cadena que tiene una longitud de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. La longitud de la saliente es independiente entre las dos cadenas, es decir, la longitud de la saliente en una cadena no depende de la longitud de la saliente en la segunda cadena. Preferiblemente, el ARNpi es capaz de promover el ARN de interferencia a través de la degradación o silenciamiento genético postranscripcional específico (PTGS) del ARN mensajero (ARNm)

objetivo.

Los ARNpi también incluyen ARN pequeños de horquilla (también llamados bucles de tallo) (ARNph). Estos ARNph pueden estar compuestos de una cadena antisentido corta (por ejemplo, de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos), seguida de un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 nucleótidos, y la cadena sentido análoga. Alternativamente, la cadena sentido puede preceder a la estructura del bucle de nucleótidos y la cadena antisentido puede seguirla. Estos ARNph pueden estar contenidos en plásmidos, retrovirus y lentivirus y expresarse a partir, por ejemplo, del promotor pol III U6 u otro promotor (véase, por ejemplo, Stewart, et al., (2003) RNA, abril; 9 (4): 493 -501). El gen o secuencia objetivo del agente de interferencia de ARN puede ser un gen celular o una secuencia genómica, por ejemplo, la secuencia de Akt1 o Akt2. Un ARNpi puede ser sustancialmente homólogo al gen objetivo o la secuencia genómica, o un fragmento del mismo. Como se usa en este contexto, el término "homólogo" se define como sustancialmente idéntico, suficientemente complementario o similar al ARNm objetivo, o un fragmento del mismo, para efectuar la interferencia de ARN del objetivo. Además de las moléculas de ARN nativas, el ARN adecuado para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia objetivo incluye derivados de ARN y análogos. Preferiblemente, el ARNpi es idéntico a su objetivo. El ARNpi preferiblemente se dirige solo a una secuencia. Cada uno de los agentes de interferencia de ARN, tales como los ARNpi, se pueden detectar en busca de posibles efectos fuera del objetivo mediante, por ejemplo, el perfil de expresión. Dichos métodos son conocidos por un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Jackson et al., Nature Biotechnology 6: 635-637, 2003. Además del perfil de expresión, también se pueden detectar las secuencias objetivo potenciales para secuencias similares en las bases de datos de secuencias para identificar secuencias potenciales que pueden tener efectos fuera del objetivo. Por ejemplo, de acuerdo con Jackson et al., (Id.), 15, o tal vez tan solo 11 nucleótidos contiguos, de identidad de secuencia son suficientes para silenciar directamente las transcripciones no dirigidas. Por lo tanto, se puede seleccionar inicialmente los ARNpi propuestos para evitar el posible silenciamiento fuera del objetivo utilizando el análisis de identidad de secuencia mediante cualquier método de comparación de secuencia conocido, tal como BLAST. Las secuencias de ARNpi se eligen para maximizar la captación de la cadena antisentido (guía) del ARNpi en RISC y, por lo tanto, maximizar la capacidad de RISC para dirigir el ARNm de GGT humano para la degradación. Esto se puede lograr escaneando las secuencias que tienen la energía libre de unión más baja en el extremo 5' de la cadena antisentido. La energía libre más baja conduce a una mejora del desenrollamiento del extremo 5' de la cadena antisentido del dúplex de ARNpi, asegurando así que la cadena antisentido sea absorbida por RISC y dirija la escisión específica de secuencia del ARNm de Akt1 o Akt2 humano. Las moléculas de ARNpi no necesitan limitarse a aquellas moléculas que contienen solo ARN, sino que, por ejemplo, abarcan además nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente, y también incluyen moléculas en las que una molécula de azúcar ribosa se sustituye por otra molécula de azúcar o una molécula que realiza una función similar. Además, se puede usar un enlace no natural entre residuos de nucleótidos, tal como un enlace de fosforotioato. La cadena de ARN puede derivatizarse con un grupo funcional reactivo de un grupo informador, tal como un fluoróforo. Los derivados particularmente útiles se modifican en un terminal o en los terminales de una cadena de ARN, típicamente el terminal 3' de la cadena sentido. Por ejemplo, el 2'-hidroxilo en el terminal 3' puede derivatizarse fácil y selectivamente con una variedad de grupos. Otros derivados de ARN útiles incorporan nucleótidos que tienen fracciones de carbohidratos modificados, tales como residuos 2'-O-alquilados o derivados de 2'-O-metil ribosilo y derivados de 2'-O-fluoro ribosilo. Las bases de ARN también pueden modificarse. Se puede usar cualquier base modificada útil para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia objetivo. Por ejemplo, se pueden incorporar bases halogenadas, tales como 5-bromouracilo y 5-yodouracilo. Las bases también se pueden alquilar, por ejemplo, se puede incorporar 7-metilguanosina en lugar de un residuo de guanosina. También se pueden incorporar bases no naturales que producen una inhibición exitosa. Las modificaciones de ARNpi más preferidas incluyen 2'-desoxi-2'-fluorouridina o nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LAN) y dúplex de ARN que contienen fosfodiéster o un número variable de enlaces de fosforotioato. Dichas modificaciones son conocidas por un experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Braasch et al., Biochemistry, 42: 7967-7975, 2003. La mayoría de las modificaciones útiles a las moléculas de ARNpi se pueden introducir utilizando químicas establecidas para la tecnología de oligonucleótidos antisentido. Preferiblemente, las modificaciones implican una modificación mínima de 2'-O-metilo, preferiblemente excluyendo dicha modificación. Las modificaciones también excluyen preferiblemente modificaciones de los grupos 5'-hidroxilo libres del ARNpi.

El agente de interferencia de ARN puede suministrarse o administrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden agregar agentes portadores adicionales, tales como liposomas, al portador farmacéuticamente aceptable. El agente de interferencia de ARN puede administrarse mediante un vector que codifica ARN pequeño de horquilla (ARNph) en un vehículo farmacéuticamente aceptable para las células en un órgano de un individuo. El ARNph es convertido por las células después de la transcripción en ARNpi capaz de dirigir, por ejemplo, Akt-1 o Akt-2.

El vector puede ser un vector regulable, tal como el vector inducible por tetraciclina. Los métodos descritos, por ejemplo, en Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5103-5106, pueden usarse utilizando vectores pTet-On (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Los agentes de interferencia de ARN utilizados en los métodos descritos en el presente documento pueden ser absorbidos activamente por las células *in vivo* después de la inyección intravenosa, por ejemplo, inyección hidrodinámica, sin el uso de un vector, que ilustra el suministro eficiente *in vivo* de los agentes de interferencia de ARN. Un método para administrar los ARNpi es el cateterismo del vaso sanguíneo del órgano objetivo. También se pueden emplear otras estrategias para el suministro de los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, los ARNpi o los ARNph utilizados en los métodos descritos en el presente documento, tales como, por ejemplo, el suministro por un vector, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, por ejemplo, un vector lentiviral. Tales

vectores se pueden usar como se describe, por ejemplo, en Xiao-Feng Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 183-188. Otros métodos de administración incluyen la administración de los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, los ARNpi o ARNph descritos en este documento, usando un péptido básico mediante conjugación o mezcla del agente de interferencia de ARN con un péptido básico, por ejemplo, un fragmento de un péptido TAT, mezclando con lípidos catiónicos o formulando en partículas. Los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, los ARNpi dirigidos a ARNm de Akt-1 o Akt-2, pueden administrarse individualmente o en combinación con otros agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, ARNpi, tales como, por ejemplo, ARNpi dirigidos a otros genes celulares. Los ARNpi de Akt también se pueden administrar en combinación con otros agentes farmacéuticos que se usan para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados con el estrés oxidativo, especialmente enfermedades respiratorias, y más especialmente asma.

Las moléculas sintéticas de ARNpi, incluidas las moléculas de ARNph, se pueden obtener utilizando una serie de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la molécula de ARNpi puede sintetizarse químicamente o producirse de manera recombinante utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como el uso de fosforamiditas de ribonucleósidos adecuadamente protegidos y un sintetizador de ADN/ARN convencional (véase, por ejemplo, Elbashir, SM et al., (2001) Nature 411 : 494-498; Elbashir, SM, W. Lendeckel y T. Tuschl (2001) Genes & Development 15: 188-200; Harborth, J. et al., (2001) J. Cell Science 114: 4557-4565; Masters, JR et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 98: 8012-8017; y Tuschl, T. et al., (1999) Genes & Development 13: 3191-3197). Alternativamente, hay varios proveedores comerciales de síntesis de ARN disponibles que incluyen, entre otros, ProLigo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE. UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE. UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE. UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE. UU.) Y Cruachem (Glasgow, Reino Unido). Como tal, las moléculas de ARNpi no son demasiado difíciles de sintetizar y se proporcionan fácilmente en una calidad adecuada para ARNi. Además, los ARNbc pueden expresarse como estructuras de bucle de tallo codificadas por vectores plasmídicos, retrovirus y lentivirus (Paddison, PJ et al., (2002) Genes Dev. 16: 948-958; McManus, MT et al., (2002) RNA 8: 842-850; Paul, CP et al., (2002) Nat. Biotechnol. 20: 505-508; Miyagishi, M. et al., (2002) Nat. Biotechnol. 20: 497-500; Sui, G. et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 99: 5515-5520; Brummelkamp, T. et al., (2002) Cancer Cell 2: 243; Lee, NS, et al., (2002) Nat. Biotechnol. 20 : 500-505; Yu, JY, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 99: 6047-6052; Zeng, Y., et al., (2002) Mol. Cell 9: 1327-1333; Robinson, DA, et al., (2003) Nat. Genet. 33: 401-406; Stewart, SA, et al., (2003) RNA 9: 493-501). Estos vectores generalmente tienen un promotor pol III secuencia arriba del ARNbc y pueden expresar cadenas de ARN sentido y antisentido por separado y/o como estructuras de horquilla. Dentro de las células, Dicer procesa el ARN pequeño de horquilla (ARNph) en ARNpi efectivo. La región objetivo de la molécula de ARNpi descrita en el presente documento puede seleccionarse de una secuencia de gen objetivo dada, por ejemplo, una secuencia codificante de Akt-1 o Akt-2, que comienza desde aproximadamente 25 a 50 nucleótidos, desde aproximadamente 50 a 75 nucleótidos, o desde aproximadamente 75 a 100 nucleótidos secuencia abajo del codón de inicio. Las secuencias de nucleótidos pueden contener UTR 5' o 3' y regiones cercanas al codón de inicio. Un método para diseñar una molécula de ARNpi descrita en el presente documento implica identificar el motivo de secuencia de 23 nucleótidos AA (N19) TT (SEQ ID NO: 21) (en el que N puede ser cualquier nucleótido) y seleccionar aciertos con al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% de contenido G/C. La parte "TT" de la secuencia es opcional. Alternativamente, si no se encuentra dicha secuencia, la búsqueda puede extenderse utilizando el motivo NA (N21), en el que N puede ser cualquier nucleótido. En esta situación, el extremo 3' del ARNpi sentido se puede convertir a TT para permitir la generación de un dúplex simétrico con respecto a la composición de secuencia de las salientes 3' sentido y antisentido. La molécula de ARNpi antisentido se puede sintetizar como complemento de las posiciones de nucleótidos 1 a 21 del motivo de la secuencia de 23 nucleótidos. El uso de salientes simétricas 3' TT puede ser ventajoso para asegurar que las partículas de ribonucleoproteína pequeñas de interferencia (PRNpi) se formen con proporciones aproximadamente iguales de PRNpi que escinden el ARN objetivo sentido y antisentido (Elbashir et al., (2001) citado anteriormente y Elbashir et al., 2001 citado anteriormente). El análisis de las bases de datos de secuencias, que incluyen, entre otras, las NCBI, BLAST, Derwent y GenSeq, así como compañías de oligosíntesis disponibles comercialmente, tales como Oligoengine®, también se pueden usar para seleccionar secuencias de ARNpi contra bibliotecas de EST para garantizar que solo un gen sea dirigido.

Las secuencias de ARNpi para dirigir Akt-1, Akt-2, Akt-3, FOXO3 y p53, entre otros, también se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo, INVITROGEN^{MR}, THERMO SCIENTIFIC^{MR}, ORIGENE^{MR}, entre otros. Por ejemplo, se pueden obtener ARNpi Stealth validados para Akt-1 (catálogo No. VHS40082), Akt-2 (catálogo No. VHS41339) y Akt-3 (catálogo No. HSS115178) de INVITROGEN^{MR}. Además, se puede obtener ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs^{MR} de THERMO SCIENTIFIC^{MR} para FOXO3 (FOXO3A humano (2309); catálogo No. cL-003007-00-0005) y para p53 (Human TP53 (7157); catálogo No. L-003329-00-0005).

Entrega de agentes de interferencia de ARN

Los métodos para administrar agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, un ARNpi, o vectores que contienen un agente de interferencia de ARN, a las células objetivo, por ejemplo, células de queratosis seborreica, células de la piel u otras células objetivo deseadas, para la absorción incluyen la inyección de una composición que contiene el agente de interferencia de ARN, por ejemplo, un ARNpi, o directamente poniendo en contacto la célula, por ejemplo, una célula de queratosis seborreica, con una composición que comprende un agente de interferencia de ARN, por ejemplo, un ARNpi. El agente de interferencia de ARN, por ejemplo, un ARNpi se puede inyectar directamente en cualquier vaso sanguíneo, tal como una vena, arteria, vénula o arteriola, por ejemplo, mediante inyección hidrodinámica o cateterismo. La administración puede ser por una sola inyección o por dos o más inyecciones. El agente de

interferencia de ARN se suministra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden usar uno o más agentes de interferencia de ARN simultáneamente. En un ejemplo, se usa un solo ARNpi que se dirige a Akt humano. Las células específicas pueden ser dirigidas con ARN de interferencia, lo que limita los posibles efectos secundarios del ARN de interferencia causados por la orientación no específica del ARN de interferencia. El método puede usar, por ejemplo, un complejo o una molécula de fusión que comprende una fracción de direccionamiento celular y una fracción de unión de ARN de interferencia que se usa para administrar el ARN de interferencia de manera efectiva en las células. Por ejemplo, una proteína de fusión anticuerpo-protamina cuando se mezcla con ARNpi, se une a ARNpi y administra selectivamente el ARNpi a las células que expresan un antígeno reconocido por el anticuerpo, lo que resulta en el silenciamiento de la expresión génica solo en aquellas células que expresan el antígeno. La fracción de unión de la molécula inductora de ARNpi o ARN de interferencia es una proteína o un dominio de unión a ácido nucleico o fragmento de una proteína, y la fracción de unión se fusiona a una porción de la fracción de direccionamiento. La ubicación de la fracción de direccionamiento puede ser en el extremo terminal carboxilo o terminal amino del constructo o en el medio de la proteína de fusión. También se puede emplear un mecanismo de administración mediado por virus para administrar ARNpi a las células *in vitro* e *in vivo* como se describe en Xia, H. et al., (2002) Nat Biotechnol 20 (10): 1006). Los mecanismos de suministro de ARNph mediados por plásmidos o virales también se pueden emplear para administrar ARNph a células *in vitro* e *in vivo* como se describe en Robinson, D.A., et al., ((2003) Nat. Genet. 33: 401-406) y Stewart, S.A., et al., ((2003) RNA 9: 493-501). Los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, Los ARNpi o ARNph, se pueden introducir junto con los componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: mejorar la absorción de los agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, ARNpi por la célula, por ejemplo, linfocitos u otras células, inhibir la hibridación de cadenas individuales, estabilizar cadenas individuales o bien facilitar el suministro a la célula objetivo y aumentar la inhibición del gen objetivo, por ejemplo, Akt-1 o Akt-2. La dosis del agente de interferencia de ARN particular estará en una cantidad necesaria para efectuar la interferencia de ARN, por ejemplo, el silenciamiento génico postraduccional (PTGS), del gen objetivo particular, lo que conducirá a la inhibición de la expresión génica objetivo o la inhibición de la actividad o nivel de la proteína codificada por el gen objetivo.

La célula de queratosis seborreica puede ponerse en contacto *ex vivo* o *in vitro*. En un ejemplo, la composición inhibe la expresión de Akt-1 y/o Akt-2.

Inhibición de la molécula pequeña de la ruta de señalización de Akt

Como se usa en el presente documento, el término "molécula pequeña" se refiere a un agente químico que incluye, pero no se limita a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, aptámeros, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, que incluyen compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

Esencialmente, cualquier inhibidor de molécula pequeña de la ruta de señalización de Akt puede usarse en el tratamiento de la queratosis seborreica usando los métodos descritos en este documento. El inhibidor de molécula pequeña de la ruta de señalización de Akt puede ser un inhibidor de Akt-1, Akt-2, Akt-3 o una combinación de los mismos. El inhibidor de molécula pequeña de la ruta de señalización de Akt puede ser un inhibidor competitivo del ATP del Akt. El inhibidor competitivo del ATP del Akt puede reducir la fosforilación de GSK-3 β . De acuerdo con la invención, el inhibidor de molécula pequeña es un inhibidor competitivo del ATP del Akt y es A-443654 o GSK-690693.

Algunos ejemplos no limitantes de compuestos de molécula pequeña útiles en el tratamiento de la queratosis seborreica como se describe en el presente documento incluyen kaempferol, elipticina (con inhibición de Akt), nutlina-3 y puromicina.

Vehículos farmacéuticamente aceptables

Como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" y las variaciones gramaticales del mismo, ya que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse a un mamífero sin producción de efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareos, malestar gástrico y similares. Cada vehículo también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no promoverá el aumento de una respuesta inmune a un agente con el que se mezcla, a menos que se desee. La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma se entiende bien en la técnica y no necesita limitarse con base en la formulación. La formulación farmacéutica contiene un compuesto como se describe en el presente documento en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables. El vehículo puede estar en forma de un diluyente sólido, semisólido o líquido, crema o una cápsula. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensiones, en líquido antes del uso. La preparación también se puede emulsionar o presentar como una composición de liposomas. El ingrediente activo se puede mezclar con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos

descritos en el presente documento. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores de pH y similares que mejoran la efectividad del ingrediente activo. La composición terapéutica puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de sus componentes. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares. Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y el agua, o contienen un tampón como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Aún más, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y con exclusión del agua. Ejemplos de tales fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de agua y aceite. La cantidad de un agente activo usado en la invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La frase "vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, involucrado en llevar o transportar los agentes objetivo desde un órgano o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo.

Dosis, Administración y Eficacia

Como se usa en el presente documento, "administrado" se refiere a la colocación de un agente que induce apoptosis (por ejemplo, un inhibidor de la ruta de señalización de Akt) en un sujeto mediante un método o ruta que da como resultado una localización al menos parcial del inhibidor en un sitio deseado. Un agente que induce la apoptosis puede administrarse por cualquier ruta apropiada que resulte en un tratamiento efectivo en el sujeto, es decir, la administración da como resultado el suministro en una ubicación deseada en el sujeto en el que al menos una parte de la composición suministrada, es decir, al menos un agente que inhibe Akt, está activo en el sitio deseado por un período de tiempo. El período de tiempo que el inhibidor está activo depende de la vida media *in vivo* después de la administración a un sujeto, y puede ser tan corto como unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, a unos pocos días, hasta varios años. Los modos de administración incluyen inyección, infusión, instilación, tópica o ingestión. "Inyección" incluye inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebro espinal e inyección intraesternal e infusión. En una realización, el modo de administración es tópico.

En un método para tratar la queratosis seborreica (SK), se administra una cantidad eficaz de un agente que induce la apoptosis a un paciente diagnosticado con una o más SK. El sujeto puede ser un mamífero (por ejemplo, un mamífero primate o no primate). El mamífero puede ser humano, aunque el enfoque es efectivo con respecto a todos los mamíferos. El método puede comprender administrar al sujeto primate (por ejemplo, un ser humano) una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un agente que induce la apoptosis. Una "cantidad efectiva" significa una cantidad o dosis generalmente suficiente para lograr el beneficio terapéutico o profiláctico deseado en sujetos sometidos a tratamiento. Las cantidades o dosis efectivas de un agente que induce la apoptosis para el tratamiento como se describe en el presente documento pueden determinarse mediante métodos de rutina tales como modelado, estudios de aumento de dosis o ensayos clínicos, y teniendo en cuenta factores de rutina, por ejemplo, el modo o la rutina de administración del suministro del agente, la farmacocinética de la composición, la gravedad y el curso del trastorno o afección, la terapia previa o en curso del sujeto, el estado de salud del sujeto y la respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico tratante. Un ejemplo de dosis para un humano está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 g de peso corporal del sujeto por día.

Aunque el intervalo de dosificación para la composición que comprende un agente que induce la apoptosis depende de la potencia de la composición e incluye cantidades suficientemente grandes para producir el efecto deseado (por ejemplo, aumento de la muerte celular), la dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos inaceptables. Generalmente, la dosificación variará con la formulación (por ejemplo, formulaciones orales, tópicas, iv, o subcutánea) y con la edad, la condición y el sexo del paciente. La dosis puede ser determinada por un experto en la materia y también puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier complicación. Por lo general, la dosis oscilará entre 0,001 mg/día y 500 mg/día. El intervalo de dosificación puede ser de 0,001 mg/día a 400 mg/día, de 0,001 mg/día a 300 mg/día, de 0,001 mg/día a 200 mg/día, de 0,001 mg/día a 100 mg/día, de 0,001 mg/día a 50 mg/día, de 0,001 mg/día a 25 mg/día, de 0,001 mg/día a 10 mg/día, de 0,001 mg/día a 5 mg/día, de 0,001 mg/día a 1 mg/día, de 0,001 mg/día a 0,1 mg/día, de 0,001 mg/día a 0,005 mg/día. Alternativamente, el intervalo de dosis puede ajustarse para mantener los niveles en suero entre 5 µg/mL y 30 µg/mL. La administración de las dosis mencionadas anteriormente puede repetirse durante un período de tiempo limitado o según sea necesario. Las dosis pueden administrarse o aplicarse una vez al día, o varias veces al día, por ejemplo, pero sin limitarse a tres veces al día. Las dosis mencionadas anteriormente pueden administrarse diariamente durante varias semanas o meses. La

duración del tratamiento depende del progreso clínico del sujeto y la capacidad de respuesta a la terapia. Se contemplan dosis continuas de mantenimiento relativamente bajas después de una dosis terapéutica inicial más alta. Los agentes útiles en los métodos y composiciones descritos en este documento pueden administrarse por ruta tópica, intravenosa (por bolo o infusión continua), por vía oral, por inhalación, por vía intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria, y pueden administrarse por medios peristálticos, si se desea, o por otros medios conocidos por los expertos en la materia. Aunque es poco común para el tratamiento de una SK, el agente puede administrarse por vía sistémica. Las composiciones terapéuticas que contienen al menos un agente pueden administrarse convencionalmente en una dosis unitaria. El término "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido fisiológicamente aceptable, es decir, portador o vehículo.

La eficacia de un tratamiento que comprende un agente que induce la apoptosis en el tratamiento de una SK puede ser determinada por un médico experto. Sin embargo, un tratamiento se considera un "tratamiento efectivo", como se usa el término en el presente documento, si uno cualquiera o todos los signos o síntomas, como por ejemplo, la apariencia de la SK se alteran de manera beneficiosa, otros síntomas clínicamente aceptados o los marcadores de enfermedad mejoran o se alivian, por ejemplo, en al menos un 10% después del tratamiento con un inhibidor. Los expertos en la técnica conocen los métodos para medir estos indicadores y/o se describen en este documento.

Referencias o muestras de referencia

Los términos "nivel de referencia", "muestra de referencia" y "referencia" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren al nivel de expresión o actividad de una proteína en la ruta de señalización de Akt (por ejemplo, Akt-1 y/o Akt -2) en una muestra conocida con la que se compara otra muestra (es decir, una muestra de piel obtenida de un sujeto que tiene una queratosis seborreica). Un estándar es útil para determinar la cantidad o el aumento/disminución relativo de la apoptosis o la muerte celular en una muestra biológica. Un estándar sirve como nivel de referencia para la comparación, de modo que las muestras se pueden normalizar a un estándar apropiado para inferir la presencia, ausencia o extensión de la apoptosis en un sujeto. Se puede obtener un estándar biológico del mismo individuo que se probará o tratará como se describe en el presente documento, antes del inicio del tratamiento. Alternativamente, un estándar puede ser del mismo individuo que se haya tomado en un momento posterior al inicio o diagnóstico de una queratosis seborreica. En tales casos, el estándar puede proporcionar una medida de la eficacia del tratamiento. Se puede obtener un nivel estándar, por ejemplo, de una muestra biológica conocida de un individuo diferente (por ejemplo, no el individuo que se está probando) que está sustancialmente libre de una queratosis seborreica. También se puede obtener una muestra conocida agrupando muestras de una pluralidad de individuos para producir un estándar sobre una población promedio, en la que un estándar representa un nivel promedio de apoptosis entre una población de individuos (por ejemplo, una población de individuos que tienen queratosis seborreica (SK)). Por lo tanto, el nivel de apoptosis en un estándar obtenido de esta manera es representativo de un nivel promedio de muerte celular en una población general de individuos con SK. Se compara una muestra individual con este estándar de población comparando el nivel de apoptosis de una muestra en relación con el estándar de población. Generalmente, un aumento en la cantidad de muerte celular sobre el estándar indicará la eficacia del tratamiento con la composición, mientras que una disminución en la cantidad de apoptosis indicará que el tratamiento no es efectivo para reducir un síntoma de SK en ese individuo. Cabe señalar que a menudo hay variabilidad entre los individuos en una población, de modo que algunos individuos tendrán niveles más altos de apoptosis, mientras que otros individuos tienen niveles más bajos. Sin embargo, un experto en la materia puede hacer inferencias lógicas de forma individual con respecto a la detección y el tratamiento de una SK como se describe en el presente documento. También se puede sintetizar un estándar o una serie de estándares. Se puede preparar una cantidad conocida de un marcador apoptótico (o una serie de cantidades conocidas) dentro del intervalo de expresión típico para el marcador que se observa en una población general. Este método tiene la ventaja de poder comparar la extensión de la enfermedad en uno o más individuos en una población mixta. Este método también puede ser útil para sujetos que carecen de una muestra previa para actuar como estándar o para el seguimiento de rutina posterior al diagnóstico. Este tipo de método también puede permitir que se realicen pruebas estandarizadas entre varias clínicas, instituciones o países, etc.

Ensayos de detección

Los ensayos de detección contemplados en el presente documento pueden usarse para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de prueba (por ejemplo, péptidos, anticuerpos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas (orgánicas o inorgánicas) u otros fármacos) que modulan la apoptosis o la actividad de la ruta de señalización de Akt. Estos ensayos están diseñados para identificar compuestos, por ejemplo, que inducen la muerte celular, particularmente a través de la apoptosis, por ejemplo, un modulador de la ruta de señalización de Akt.

Un ensayo puede ser un ensayo basado en células que comprende poner en contacto una célula de queratosis seborreica en cultivo con un agente candidato y determinar la capacidad del agente candidato para modular (por ejemplo, inducir o inhibir) la apoptosis y/o la actividad de la ruta de señalización de Akt.

Los compuestos de prueba o agentes candidatos pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas en

fase sólida o en fase de solución paralela direccionable espacialmente; métodos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; el método de biblioteca de "una perla un compuesto" y los métodos de biblioteca sintética que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica se limita a las bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a las bibliotecas de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas de compuestos (Lam, KS (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145).

Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la técnica, por ejemplo en: DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann et al., (1994) *J. Med. Chem* 37: 2678; Cho et al., (1993) *Science* 261: 1303; Carrell et al., (1994) *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell et al., (1994) *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y en Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem* 37: 1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (Lam (1991) *Nature* 354: 82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364 : 555-556), bacterias (Ladner patente de los Estados Unidos No. 5.223.409), esporas (Ladner patente de los Estados Unidos No. 5.223.409), plásmidos (Cull et al., (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249: 386-390); (Devlin (1990) *Science* 249: 404-406); (Cwirla et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-310); (Ladner citado anteriormente).

Los métodos descritos en el presente documento se refieren además a agentes nuevos identificados por los ensayos de detección descritos anteriormente. Con respecto a la intervención, cualquier tratamiento que module la apoptosis y/o la actividad de la ruta de señalización de Akt debe considerarse como candidato para la intervención terapéutica humana.

A continuación se describe lo siguiente:

1. Un método para tratar una queratosis seborreica en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que inhibe la ruta de señalización de Akt a un sujeto que tiene una queratosis seborreica.

2. El método del párrafo 1, en el que la composición se aplica tópicamente o se administra sistémicamente.

3. El método del párrafo 1, que comprende además una etapa para diagnosticar al sujeto con una queratosis seborreica.

4. El método del párrafo 1, en el que la cantidad terapéuticamente efectiva de la composición no afecta sustancialmente la supervivencia de los queratinocitos normales.

5. El método del párrafo 1, en el que la composición comprende una molécula pequeña, un inhibidor peptídico o una molécula de ARNi.

6. El método del párrafo 1, en el que la composición es un inhibidor de Akt-1 y/o de Akt-2.

7. El método del párrafo 1, en el que la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Un método para inducir apoptosis en una célula de queratosis seborreica, comprendiendo el método poner en contacto una célula de queratosis seborreica con una cantidad efectiva de una composición que inhibe la señalización de Akt, induciendo así la apoptosis en la célula.

9. El método del párrafo 8, en el que la cantidad efectiva de la composición no afecta sustancialmente la supervivencia de los queratinocitos normales.

10. El método del párrafo 8, en el que la composición comprende una molécula pequeña, un inhibidor de péptidos o una molécula de ARNi.

11. El método del párrafo 8, en el que la composición es un inhibidor de Akt-1 y/o de Akt-2.

12. Un método para cultivar células de queratosis seborreica *ex vivo*, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células de queratosis seborreica obtenidas de un sujeto con una solución que comprende una enzima dispasa a una temperatura y durante un tiempo suficiente para iniciar la disociación de las células de queratosis seborreica de la muestra biológica, y

(b) cultivar las células de queratosis seborreica disociadas.

13. El método del párrafo 12, en el que la temperatura está por debajo de una temperatura ambiente estándar de 21 °C.

14. El método del párrafo 12, en el que el tiempo suficiente para iniciar la digestión de las células de queratosis seborreica es de al menos 15 horas.

15. El método del párrafo 12, que comprende además una etapa de poner en contacto la muestra biológica que comprende células de queratosis seborreica con una proteasa adicional.

16. El método del párrafo 15, en el que la proteasa adicional es tripsina.

17. El método del párrafo 10, que comprende además una etapa de agregar un medio de cultivo y filtrar partículas más grandes de las células disociadas antes del cultivo de la etapa (b).

18. El método del párrafo 10, en el que las células disociadas se cultivan en placas recubiertas.

19. Un ensayo de detección que comprende células de queratosis seborreica cultivadas obtenidas utilizando el método del párrafo 10.

20. Un método para detectar un agente candidato para inducir apoptosis, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto una célula de queratosis seborreica o una población de células de queratosis seborreica con un agente candidato, y
- (b) medir la apoptosis en la célula o población de células,

5 en el que un aumento en la apoptosis en la célula o población de células indica que el agente candidato induce apoptosis.

21. El método del párrafo 20, en el que el agente candidato comprende un inhibidor de la ruta de señalización de Akt.

22. El método del párrafo 20, en el que la célula de queratosis seborreica o la población de células de queratosis seborreica se cultivan usando el método del párrafo 10.

10 23. El método del párrafo 20, en el que la apoptosis se mide usando el ensayo de sulforrodamina B (SRB), tinción con tetrazolio MTT, tinción con TUNEL, tinción con anexina V, tinción con yoduro de propidio, escalado de ADN, escisión con PARP, activación de caspasa y/o evaluación de células y morfología nuclear.

24. El método del párrafo 20, en el que el agente candidato es una molécula pequeña, un inhibidor peptídico o una molécula de ARNi.

15 25. Un ensayo que comprende:

- (a) poner en contacto una población de células de queratosis seborreica disociada con un agente candidato,
- (b) poner en contacto las células de la etapa (a) con un anticuerpo detectable específico para una proteína apoptótica,
- (c) medir la intensidad de la señal del anticuerpo detectable unido,
- (d) comparar la intensidad medida de la señal con un valor de referencia y si la intensidad medida aumenta en relación con el valor de referencia,
- (e) identificar el agente candidato como un inductor de apoptosis en la célula.

26. El ensayo del párrafo 25, en el que el agente candidato comprende un inhibidor de la ruta de señalización de Akt.

27. El ensayo del párrafo 25, en el que la población de células de queratosis seborreica se cultiva utilizando el método del párrafo 10.

25 28. El ensayo del párrafo 25, en el que la proteína apoptótica es una proteína caspasa, una proteína PARP o un producto de escisión de la misma.

29. Un método para cultivar células de queratosis seborreica *ex vivo*, que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células de queratosis seborreica obtenidas de un sujeto con una solución que comprende inicialmente una enzima dispasa y posteriormente una enzima tripsina a una temperatura y durante un tiempo suficiente para disociar las células de queratosis seborreica de la muestra biológica,
- y
- (b) cultivar las células de queratosis seborreica disociadas.

30

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

35 Aunque los informes recientes indican que, en comparación con la piel normal, las SK mostraron niveles significativamente elevados de Akt fosforilado, se sabe muy poco sobre la importancia biológica de estos hallazgos debido en parte al hecho de que los esfuerzos para estudiar las SK se han visto obstaculizados por la incapacidad para cultivar las células de estas lesiones *in vitro*, un problema común a muchos tumores benignos. Los inventores han superado este obstáculo y también han desarrollado una técnica de explante que permite que todas las muestras de biopsias de SK de pacientes sean estudiadas durante varios días en el laboratorio. Se utilizaron paneles de inhibidores específicos de la señalización de la quinasa para mapear las rutas moleculares críticas para la viabilidad de las células de SK. Específicamente, la señalización de la quinasa Akt es crucial para evitar que las células de SK experimenten la muerte celular programada. Tanto los inhibidores de moléculas pequeñas como la inactivación de Akt ARNpi inducen la muerte celular dependiente de caspasa mediante la activación de FoxO3. La p53 endógena de tipo silvestre también parece ser crítica tanto para mantener un estado tumoral benigno como para dirigir el programa apoptótico después de la inhibición de Akt. Con base en estos hallazgos, los inventores plantearon la hipótesis de que la alteración genómica en las células de SK da como resultado la activación constitutiva de Akt y sus objetivos posteriores, tales como la ruta FoxO3A, que es esencial para el crecimiento y la supervivencia de estas lesiones SK tanto *in vitro* como *in vivo*.

50 Actualmente no hay tratamientos farmacológicos aprobados para SK. La comprensión y quizás el control farmacológico sobre este cambio de benigno a maligno podría tener un impacto en el tratamiento de las SK, así como en muchos otros tipos de lesiones epidérmicas benignas.

Ejemplo 1: Los cultivos primarios de muestras de pacientes son un enfoque novedoso para estudiar las SK

55 Los datos presentados en este documento, así como la evidencia de informes publicados recientemente^{5,7} apuntan a una combinación única de aberraciones genómicas oncogénicas en lesiones de SK. Sin embargo, las consecuencias moleculares de estos cambios podrían estudiarse solo hasta cierto punto a nivel histológico en el tejido recolectado o mediante la correlación con cambios similares en los queratinocitos humanos cultivados normales. Por lo tanto, los inventores trataron de ampliar la capacidad de abordar preguntas y formular hipótesis sobre determinantes del

desarrollo de tumores epidérmicos benignos en un sistema de cultivo celular *in vitro* bien definido. Esto resultó ser una tarea desafiante que requirió meses y meses de intentos frustrantes para alcanzar la combinación adecuada de digestión enzimática y disociación del tejido físico. En particular, las SK pueden eliminarse mediante una técnica quirúrgica, que no recolecta tejido de grosor completo sino que tiene como objetivo la preservación de la dermis, lo que hace que el "desprendimiento" regular de la epidermis después de la incubación con dispasa sea casi imposible.

Los inventores pudieron modificar la técnica descrita anteriormente^{23,24} para cultivos primarios de queratinocitos humanos normales y la adaptaron para el aislamiento exitoso de la suspensión de células de SK individuales y la posterior expansión en cultivo (Figura 3A). Se identificaron tres tipos genómicos principales de células primarias de SK: 1) con mutaciones en FGFR3; 2) con mutaciones en PIK3CA; y 3) no se detectaron mutaciones. Las células se cultivaron después de la secuenciación de los genes objetivo para las aberraciones de partes problemáticas, como se muestra en la Figura 6. Pasar hasta tres veces fue exitoso en este momento, pero los inventores decidieron realizar todos los experimentos con células de la pasada uno o dos. Es importante destacar que todos los tipos de células primarias de SK mostraron sobreexpresión de FOXN1 en cultivo (Figura 3B).

Ejemplo 2: Las células primarias de SK dependen de la señalización de Akt activada para la supervivencia

Una evidencia considerable sugiere que un sello distintivo de las lesiones SK es la supervivencia mejorada y las tasas de apoptosis más bajas²⁵. Los inventores buscaron identificar las principales rutas responsables de esta característica. Las alteraciones genómicas caracterizadas previamente en SK señalan el hecho de que la activación patológica de las rutas de señalización del receptor de tirosina quinasa puede impulsar la supervivencia de este tipo de tumores. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la inhibición de la señalización de la quinasa induciría la muerte celular en las células de SK.

Debido a la fragilidad de los cultivos primarios, la transfección de ARNi de alto rendimiento resultó ser un desafío, lo que provocó el uso de una colección de inhibidores específicos de la quinasa de molécula pequeña para determinar qué quinasa es esencial para la supervivencia de las células de SK pero no de queratinocitos humanos normales. Este nivel de selectividad se introdujo para apuntar específicamente a la dependencia causada por alteraciones genómicas (tanto mutaciones como sobreexpresión). Los experimentos se realizaron utilizando los tres tipos de células primarias de SK (con mutaciones FGFR3; con mutaciones PIK3CA; sin mutaciones en ninguno de estos genes) y, sorprendentemente, los resultados fueron consistentemente similares (Figura 4). De los 20 inhibidores de quinasa probados, tres tuvieron un efecto destructor superior al 60% y solo un compuesto obtuvo una puntuación superior al 80% (Figura 4A). Es importante destacar que los inventores no observaron una muerte celular considerable con estos compuestos en los queratinocitos primarios normales emparejados y no emparejados. Los compuestos, que se calificaron como inductores de muerte celular de SK en este ensayo, fueron moduladores de la misma ruta de señalización: inhibidores de PI3K/mTOR (actividad más débil: compuestos 11 (C11) y 12 (C12)) y un inhibidor competitivo del ATP del Akt (compuesto 8, (C8), también conocido como A-443654 26), que tuvo una actividad muy fuerte.

Curiosamente, el inhibidor alostérico de Akt incluido en la detección, el compuesto 9 (C9, también conocido como AT7867) no afectó la viabilidad de las células de SK. Este efecto se confirmó y se observó un efecto destructor de respuesta a la dosis de C8 en las células de SK, mientras que los queratinocitos normales no se vieron afectados incluso con dosis más altas. Para verificar la actividad de C8 en el presente ensayo, se estudió el estado de fosforilación de Akt en las células de SK y se observó una hiperfosforilación paradójica de Akt en T308 y S473, que es característica de este tipo de moléculas^{27,28}. Como se informó recientemente, esta hiperfosforilación se debe al acoplamiento del compuesto en el sitio de unión de ATP, lo que impide la interacción de Akt con sus objetivos secuencia abajo²⁷. Como se muestra en la Figura 5B, las células de SK tratadas con C8 tienen realmente una Akt hiperfosforilada, pero lo más importante es que la señalización secuencia abajo de Akt se apagó (Figura 5C). La sensibilidad de las células contra los inhibidores competitivos de ATP se confirmó nuevamente ya que el inhibidor alostérico no mostró ningún efecto (Figura 5A).

Las células de SK se trataron con otro inhibidor competitivo del ATP del Akt (GSK690693, 29) y se observó una inducción similar de muerte celular (Figura 5A). Los inhibidores de quinasas de molécula pequeña generalmente tienen un alto grado de especificidad hacia las quinasas en general, pero a menudo estos efectos inhibitorios se comparten entre varias quinasas, aunque en diferentes dosis. Si bien esto se considera en la mayoría de los casos como una debilidad del enfoque, también puede proporcionar alguna evidencia sobre otros posibles objetivos involucrados en el proceso de interés. Por lo tanto, los inventores describieron los dos compuestos efectivos para sus objetivos (en colaboración con el Dr. N. Gray, DFCI) y determinaron si otras quinasas podrían estar involucradas en la supervivencia de las células de SK. Sorprendentemente, aunque C8 y GSK690693 afectan a varias quinasas fuera del objetivo, solo los miembros de la familia Akt y PKC fueron objetivos compartidos (Figura 6B). Por lo tanto, se probó un inhibidor pan-PKC en las células de SK pero no se observó ningún efecto de muerte (Figura 6C), lo que indica que la inhibición de la actividad de Akt era realmente esencial para la muerte celular en las células de SK. Además, los inventores pudieron confirmar esto mediante la submodulación de los miembros de la familia de Akt utilizando un enfoque de ARNi. El agotamiento de Akt 1 y 2 a través de ARNi (por separado o juntos) tuvo un efecto destructor significativo en las células de SK (Figura 6)

Ahora se acepta ampliamente que el crecimiento, la diferenciación y la muerte de los queratinocitos en cultivo difieren

en aspectos significativos de los de la piel intacta. Por lo tanto, para reproducir de cerca la situación *in vivo* de los tumores de SK, los inventores utilizaron un sistema de explante *ex vivo*¹⁶ para cultivar lesiones de SK recién extirpadas durante hasta 7 días. Los explantes de SK se trataron mediante la aplicación tópica de 1 mM de C8 durante 48 horas y se tiñeron para Caspasa 3 activada para detectar la muerte celular. Como se muestra en la Figura 7, en el modelo *ex vivo*, la inhibición de la actividad de Akt con el inhibidor de AKT más efectivo C8 dio como resultado una muerte celular significativa de las células de SK.

Por lo tanto, los datos descritos en este documento indican que las células de SK dependen de la activación constitutiva de la ruta de Akt para la supervivencia, por lo que la inhibición de la quinasa basada en moléculas pequeñas o ARNi puede inducir la muerte celular rápida en estos tumores benignos.

Además, los inhibidores competitivos del ATP del Akt pueden suprimir la señalización de Akt secuencia abajo e inducir la muerte celular mediada por FoxO3A en células de SK pero no en queratinocitos normales. Por lo tanto, esencialmente cualquier inhibidor de molécula pequeña de la señalización de Akt puede usarse para el tratamiento farmacológico de las SK.

Ejemplo 3: La inhibición de la señalización de Akt causa la muerte celular en las células de SK a través de un mecanismo mediado por FoxO3/p53

Está bien establecido que se sabe que la activación de Akt en las células provoca efectos prosupervivencia a través de la activación/supresión de diferentes rutas dirigidas. Uno de los mecanismos comunes para la muerte celular tras la inhibición de Akt es la inducción de apoptosis, que también se observó tras el tratamiento de células de SK con C8 detectado por niveles de PARP escindido y tinción positiva con TUNEL (Figura 8A, 8B).

Por lo tanto, se investigó si alguno de los objetivos proapoptóticos prominentes de Akt estaba involucrado en este proceso. Se observó una disminución de los niveles fosforilados de FoxO1/3, así como de MDM2 fosforilado, que se correlacionó con niveles aumentados de p53 tras el tratamiento con el inhibidor de Akt (Figura 8C). Es importante destacar que cuando la expresión de FoxO3 (un objetivo directo de Akt³⁰) y/o p53 (un objetivo indirecto de Akt,^{31,32}) se redujo a través de ARNi en las células primarias de SK, los inventores pudieron rescatar el efecto mortal del inhibidor de Akt en células primarias de SK. Estos datos indican que la inhibición de Akt media una disminución de la fosforilación de FoxO3 y un aumento concomitante de los niveles de p53 posiblemente a través de la liberación de MDM2^{31,32}, que finalmente promueve la apoptosis (Figura 9)

Ejemplo 4: Ejemplo de protocolo para el cultivo de células de queratosis seborreica

En este documento se proporciona el siguiente ejemplo de método para cultivar células de SK a partir de una muestra biológica. Este método no debe interpretarse como una limitación de la invención al siguiente protocolo.

Cultivo de células de SK:

1. Recoger las muestras de SK en DPBS estéril que contenga penicilina-estreptomicina (GIBCO, 15140-122). Mantener en 40.

2. Preparar la solución previa a la dispasa:

250 mL de solución salina equilibrada de Hanks - HBSS (Gibco 14170-088)

2,5 mL de HEPES 1,0 M filtrado (GIBCO, 15630)

2,5 mL de bicarbonato de sodio filtrado al 7,5%

3. Elaboración de la solución de dispasa:

10 mg/mL de dispasa en solución previo a la dispasa y filtrar con un filtro de 0,2 micras

4. Colocar las piezas de SK planas en un recipiente adecuado (generalmente placa de 12 pozos) hacia arriba. Agregar aproximadamente 0,5 mL de solución dispasa alrededor de las SK hasta que estén flotando.

5. Colocar en 4°C durante al menos 18 h (hasta 24) ESTO ES CRÍTICO

Al siguiente día:

6. Agregar 5 mL de tripsina-EDTA a un tubo Falcon de 50 mL y calentarlo a 27 °C. Tomar las piezas de SK de la dispasa y colocarlas en la Tripsina-EDTA. Colocar el tubo en la incubadora para mantener a 37 °C durante 5-7 minutos. Varias veces, durante ese período, agitar cuidadosamente el tubo.

7. Agregar 10 mL de DMEM + FBS al 10% en el tubo, mezclar y usar un filtro celular para eliminar las partículas más grandes que quedan.

8. Centrifugar a 1000 RPM durante 10 minutos

9. Resuspender las células en medio HKC y sembrar en placas recubiertas de colágeno.

10. Cambiar el medio cada dos días.

Estos estudios indican la dependencia de los tumores epidérmicos benignos en la activación de la señalización de Akt para la supervivencia. Los experimentos descritos en el presente documento están diseñados para revelar cómo las alteraciones genómicas descritas previamente en SK pueden contribuir a la activación de esta ruta, así como para identificar sus objetivos secuencia abajo responsables de la transducción de los efectos prosupervivencia.

Informes recientes indican que las SK epidérmicas comúnmente albergan mutaciones somáticas en oncogenes clave tales como FGFR3, PIK3CA, HRAS, EGFR y AKT^{15,7,33}. Estas alteraciones representan la regulación directa de dos rutas moleculares esenciales en los queratinocitos: las cascadas de señalización ERK/MAPK y PI3K. De manera similar, los estudios previos de los inventores sobre la patogénesis de SK también identificaron aberraciones secuencia arriba de las mismas rutas de señalización, incluida la sobreexpresión de varios receptores de tirosina quinasas, hormonas de crecimiento y factores de transcripción⁸. Tomados en conjunto, estos datos indican que las rutas ERK/MAPK y PI3K son responsables del fenotipo tumoral benigno de estas lesiones, caracterizado por un mayor crecimiento y una respuesta apoptótica/mayor supervivencia suprimida⁷. Los datos descritos en este documento indican que a pesar de la variedad de alteraciones genómicas en SK, la dependencia del crecimiento de las células de SK converge a la señalización de Akt activada. Esta hipótesis está respaldada además por la evidencia de una mayor fosforilación de Akt en muestras de pacientes con SK que albergan diferentes mutaciones, en comparación con su epidermis sana vecina (Figura 10). Además, aunque no se detectaron mutaciones p53 en las SK⁷, la respuesta apoptótica suprimida de estas lesiones podría deberse en parte a la disminución de los niveles del efector indirecto de Akt, p53 en las mismas muestras de pacientes (Figura 10).

Los datos adicionales descritos en este documento indican que la inhibición de la fosforilación de GSK3 β en células primarias de SK es un fuerte predictor de la eficacia de los inhibidores de Akt (Figura 11).

Referencias citadas:

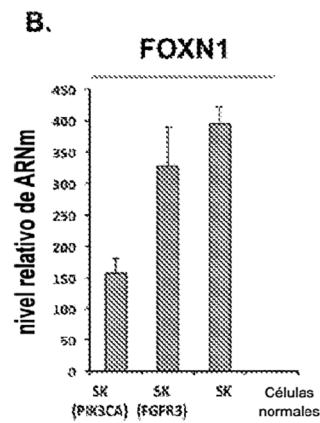
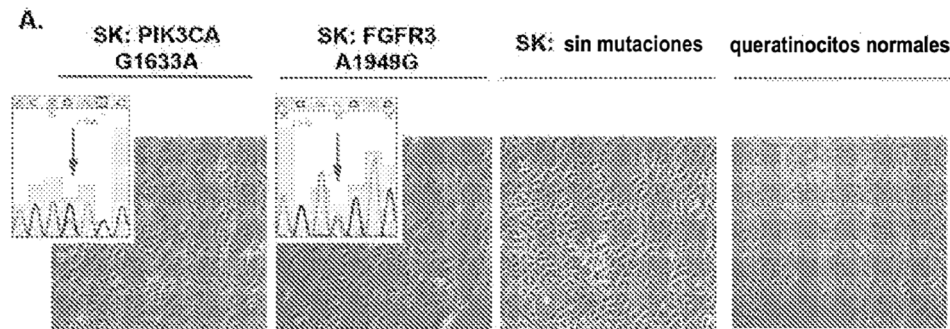
1. Armstrong, B.K. & Kricer, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63, 8-18 (2001).
2. Hildesheim, J. & Fornace, A.J., Jr. The dark side of light: the damaging effects of UV rays and the protective efforts of MAP kinase signaling in the epidermis. *DNA Repair (Amst)* 3, 567-580 (2004).
3. Kulms, D. & Schwarz, T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16, 195-201 (2000).
4. Agar, N.S., et al. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 4954-4959 (2004).
5. Hafner, C., et al. Oncogenic PIK3CA mutations occur in epidermal nevi and seborrheic keratoses with a characteristic mutation pattern. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 13450-13454 (2007).
6. Hafner, C., et al. Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest* 116, 2201-2207 (2006).
7. Hafner, C., et al. Multiple oncogenic mutations and clonal relationship in spatially distinct benign human epidermal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20780-20785 (2010).
8. Mandinova, A., et al. A positive FGFR3/FOXN1 feedback loop underlies benign skin keratosis versus squamous cell carcinoma formation in humans. *J Clin Invest* 119, 3127-3137 (2009).
9. Taube, J.M., Begum, S., Shi, C., Eshleman, J.R. & Westra, W.H. Benign nodal nevi frequently harbor the activating V600E BRAF mutation. *Am J Surg Pathol* 33, 568-571 (2009).
10. Ali, I.U., Schriml, L.M. & Dean, M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 91, 1922-1932 (1999).
11. Marte, B.M. & Downward, J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 22, 355-358 (1997).
12. Manning, B.D. & Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274 (2007).
13. Brinkman, B.M. & Wong, D.T. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 18, 228-233 (2006).
14. Di Como, C.J., et al., p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 8, 494-501 (2002).
15. Logie, A., et al. Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Hum Mol Genet* 14, 1153-1160 (2005).
16. Kolev, V., et al. EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat Cell Biol* 10, 902-911 (2008).
17. Lefort, K., et al. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCK α kinases. *Genes Dev* 21, 562-577 (2007).
18. Wu, X., et al. Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer. *Nature* 465, 368-372 (2010).
19. Luba, M.C., Bangs, S.A., Mohler, A.M. & Stulberg, D.L. Common benign skin tumors. *Am Fam Physician* 67, 729-738 (2003).
20. Baxter, R.M. & Brissette, J.L. Role of the nude gene in epithelial terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 118, 303-309 (2002).

21. Janes, S.M., Ofstad, T.A., Campbell, D.H., Watt, F.M. & Prowse, D.M. Transient activation of FOXN1 in keratinocytes induces a transcriptional programme that promotes terminal differentiation: contrasting roles of FOXN1 and Akt. *J Cell Sci* 117, 4157-4168 (2004).
22. Li, J., et al. Foxn1 promotes keratinocyte differentiation by regulating the activity of protein kinase C. *Differentiation* 75, 694-701 (2007).
23. Rheinwald, J.G. & Green, H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 265, 421-424 (1977).
24. Rheinwald, J.G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343 (1975).
25. Simionescu, O., et al. Apoptosis in seborrheic keratoses: an open door to a new dermoscopic score. *J Cell Mol Med* 16, 1223-1231 (2012).
26. Luo, Y., et al. Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors *in vivo*. *Mol Cancer Ther* 4, 977-986 (2005).
27. Okuzumi, T., et al. Inhibitor hijacking of Akt activation. *Nat Chem Biol* 5, 484-493 (2009).
28. Rodrik-Outmezguine, V.S., et al. mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discov* 1, 248-259 (2011).
29. Rhodes, N., et al. Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Cancer Res* 68, 2366-2374 (2008).
30. Brunet, A., et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868 (1999).
31. Zhou, B.P., et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3, 245-252. (2001).
32. Gottlieb, T.M., Leal, J.F., Seger, R., Taya, Y. & Oren, M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299-1303 (2002).
33. Hafner, C., et al. High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol* 126, 2404-2407 (2006).
34. Fernandez, P.L., et al. Easier tissue macroarray ("microchop") production. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11, 365 (2003).
35. Hafner, C., et al. Spectrum of FGFR3 mutations in multiple intraindividual seborrheic keratoses. *J Invest Dermatol* 127, 1883-1885 (2007).
36. Mandinova, A., et al. The FoxO3a gene is a key negative target of canonical Notch signalling in the keratinocyte UVB response. *Embo J* 27, 1243-1254 (2008).
37. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. & Sabatini, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101 (2005).
38. Naik, E., Michalak, E.M., Villunger, A., Adams, J.M. & Strasser, A. Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J Cell Biol* 176, 415-424 (2007).
39. Stahl, M., et al. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 168, 5024-5031 (2002).
40. Yao, D., et al. Fos cooperation with PTEN loss elicits keratoacanthoma not carcinoma, owing to p53/p21 WAF-induced differentiation triggered by GSK3beta inactivation and reduced AKT activity. *J Cell Sci* 121, 1758-1769 (2008).
41. El Jamali, A., et al. Reoxygenation after severe hypoxia induces cardiomyocyte hypertrophy *in vitro*: activation of CREB downstream of GSK3beta. *Faseb J* 18, 1096-1098 (2004).
42. Hsieh, A.C., et al. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 485, 55-61 (2012).
43. Feldman, M.E., et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 7, e38 (2009).
44. Liang, J., et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8, 1153-1160 (2002).
45. Kovacina, K.S., et al. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem* 278, 10189-10194 (2003).
46. Mamane, Y., et al. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 23, 3172-3179 (2004).
47. Ming, M., Shea, C.R., Feng, L., Soltani, K. & He, Y.Y. UVA induces lesions resembling seborrheic keratoses in mice with keratinocyte-specific PTEN downregulation. *J Invest Dermatol* 131, 1583-1586 (2011).
48. Hollander, M.C., Blumenthal, G.M. & Dennis, P.A. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* 11, 289-301 (2011).
49. Suzuki, A., et al. Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation. *Cancer Res* 63, 674-681 (2003).

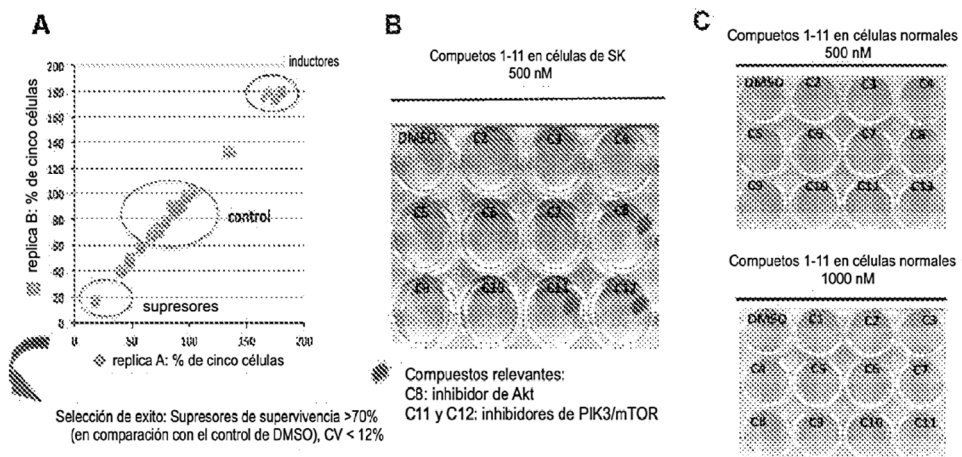
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un inhibidor competitivo del ATP de Akt para su uso en el tratamiento de la queratosis seborreica, en la que el inhibidor competitivo del ATP del Akt es (2S)-1-(1H-indol-3-il)-3-((5-(3-metil-2H-indazol-5-il)piridin-3-il)oxi)propan-2-amina (A-443654) o 4-[2-(4-Amino-1,2,5-oxadiazol-3-il)-1-etil-7-[(3S)-3-piperidinil metoxi]-1H-imidazo[4,5-c]piridin-4-il]-2-metil-3-butin-2-ol (GSK-690693).
2. La composición para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. La composición para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se aplica tópicamente o se administra sistémicamente.

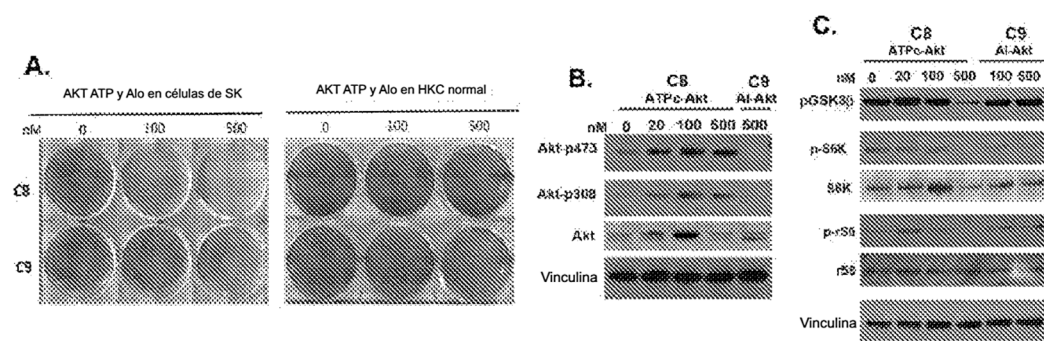
FIGs. 1A-1B



FIGs. 2A-2C



FIGs. 3A-3C



FIGs. 4A-4D

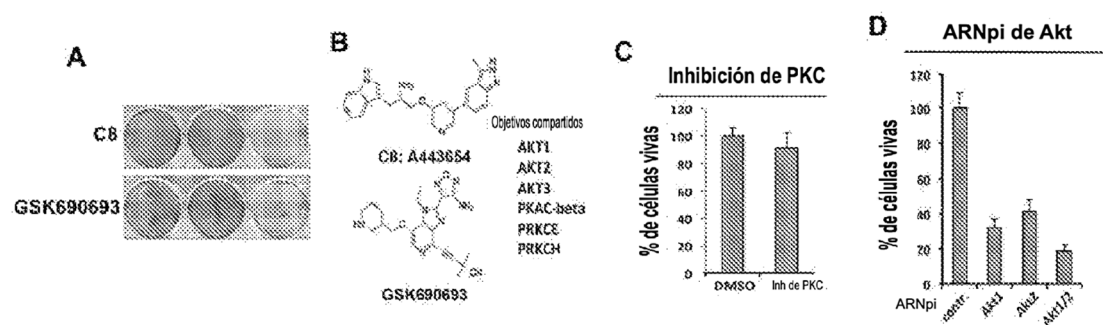
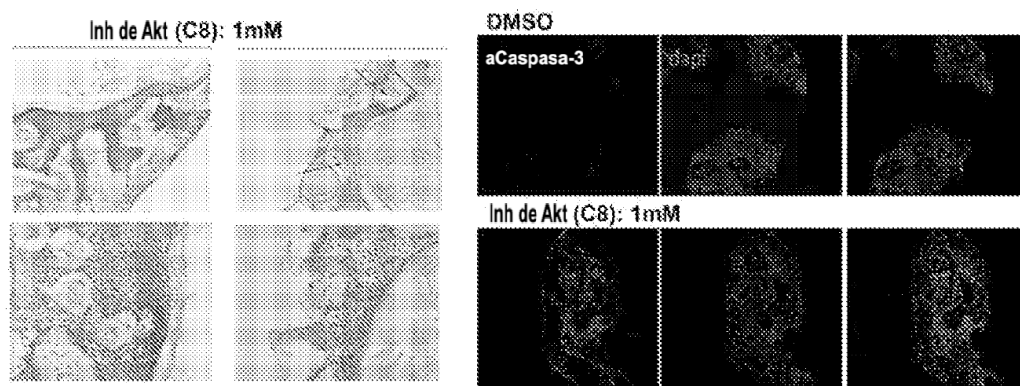
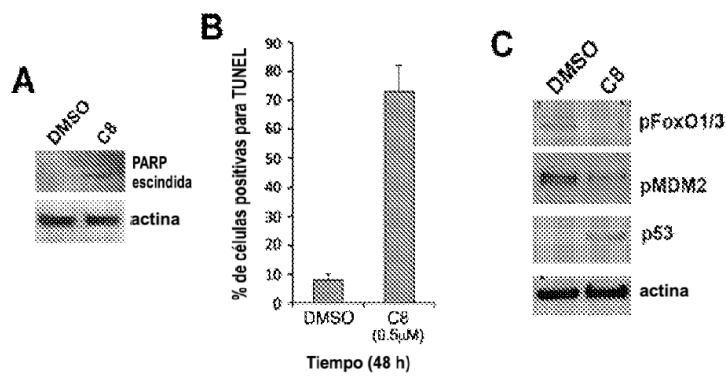


FIG. 5



FIGs. 6A-6C



FIGs. 7A-7C

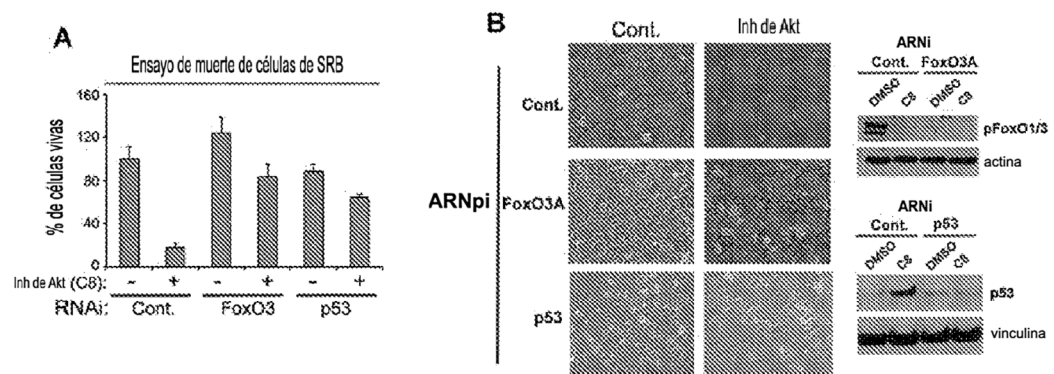
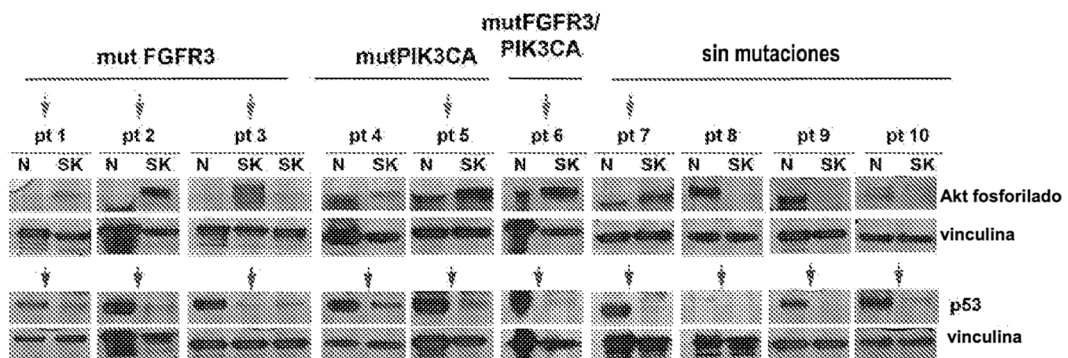


FIG. 8



FIGs. 9A-9B

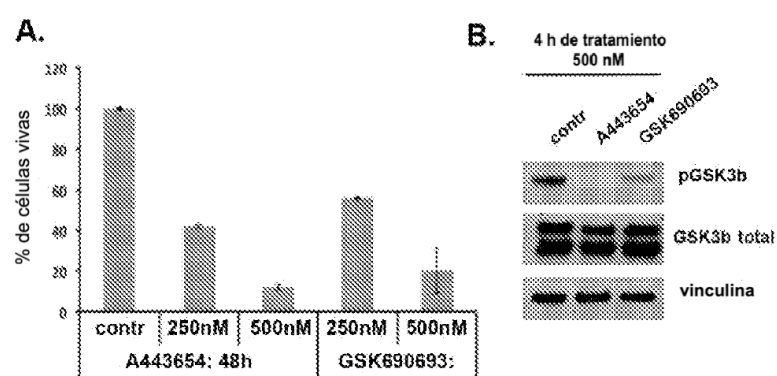


FIG. 10

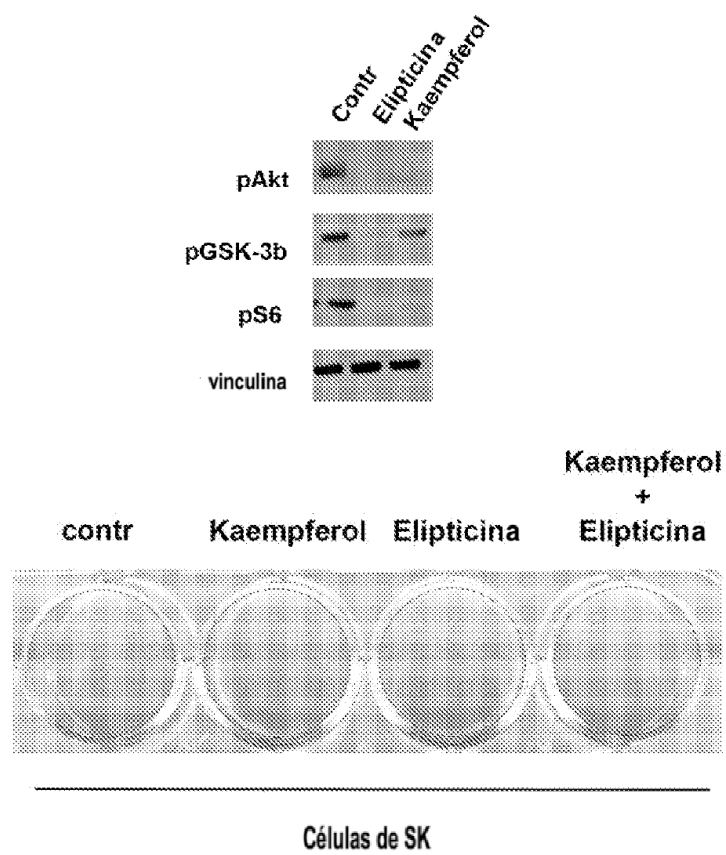


FIG. 11

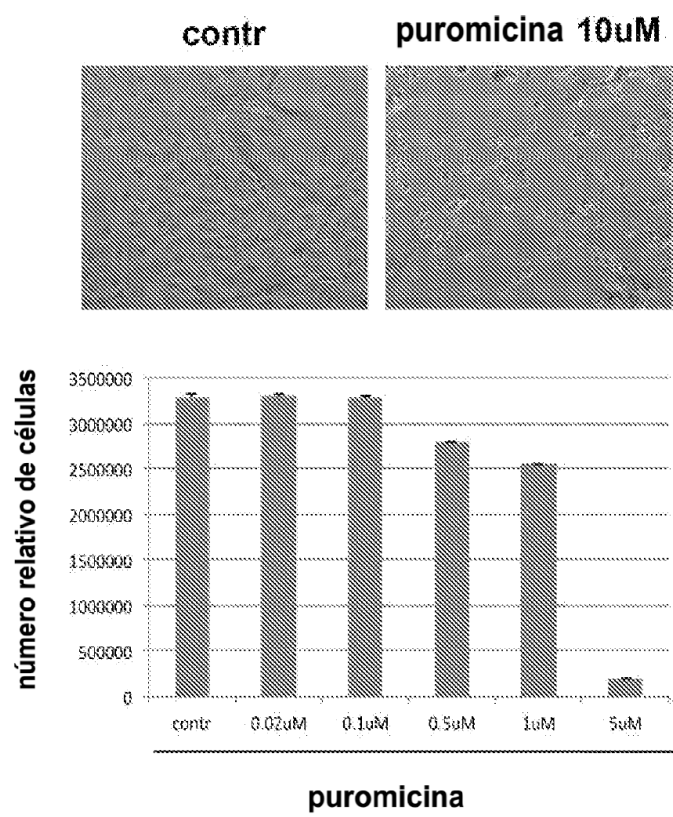


FIG. 12

