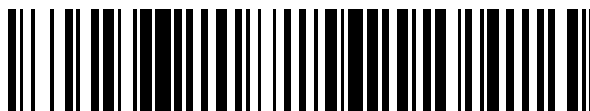


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 206**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2016 PCT/US2016/021274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16144917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2016 E 16711082 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3268025**

54 Título: **Enfoque dirigido a GDF6 y a señalización de BMP para la terapia contra el melanoma**

30 Prioridad:

10.03.2015 US 201562130749 P

20.05.2015 US 201562164304 P

25.08.2015 US 201562209789 P

23.10.2015 US 201562245614 P

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

11.02.2021

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)

225 Franklin Street

Boston, Massachusetts 02110, US

72 Inventor/es:

CEOL, CRAIG JOSEPH y

VENKATESAN, ARVIND MURALI

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 805 206 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

Enfoque dirigido a GDF6 y a señalización de BMP para la terapia contra el melanoma

5 Antecedentes

10 El melanoma es el cáncer de piel más agresivo y mortal, y mata a más de 9000 estadounidenses y al menos 48 000 personas en todo el mundo cada año. Las mutaciones de ganancia de función que sobreactivan la serina/treonina quinasa BRAF están presentes en la mayoría de los melanomas. Sin embargo, estas mutaciones también se encuentran en nevos benignos (lunares), lo que indica que se requieren otras alteraciones genéticas para la melanomagenesis. Las vías adicionales también están implicadas en el mantenimiento del melanoma y la resistencia a fármacos, ya que los tumores mutantes para BRAF no responden, o responden y después recaen rápidamente, frente al tratamiento con inhibidores de BRAF.

15 Recientemente se aprobaron dos nuevas terapias para tratar melanomas. Si bien estas terapias representan un progreso en la lucha contra el melanoma, no son curativas. Por ejemplo, los pacientes tratados con el inhibidor de BRAFV600E, vemurafenib, experimentan solo un beneficio de supervivencia de 3-6 meses. El melanoma avanzado sigue siendo una enfermedad mortal con una supervivencia a cinco años de menos del 15 %.

20 Resumen de la invención

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones anexas.

25 En un primer aspecto, la invención se dirige a un inhibidor de GDF6 para su uso en el tratamiento de un melanoma en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un inhibidor de GDF6. El sujeto puede ser un mamífero no humano o un ser humano. La inhibición de la actividad de GDF6 puede provocar la apoptosis de una célula de melanoma y puede reducir la señalización corriente abajo de un receptor de BMP con el que interactúa GDF6 en comparación con un control adecuado. La reducción de la señalización corriente abajo de un receptor de BMP puede reducir la fosforilación de SMAD 1/5/8. El inhibidor puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo, 30 un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico antisentido, un polipéptido de receptor soluble y una molécula pequeña. El ácido nucleico antisentido puede seleccionarse del grupo que consiste en un ARNi, una ribozima, una molécula de ácido nucleico α -anomérico y un ácido nucleico peptídico; y el ARNi puede comprender un ARNip o un ARNsh. El polipéptido de receptor soluble puede ser un polipéptido de ALK3 soluble, tal como la fusión ALK3(24-152)-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.

35 Un segundo aspecto describe un método de ensayo de detección para identificar un compuesto que disminuye la actividad de GDF6, que comprende

- 40 (a) proporcionar una composición in vitro que comprende al menos una célula de melanoma; (b) poner en contacto la composición con un compuesto de prueba; y (c) determinar un efecto del compuesto de prueba sobre una actividad de GDF6 en la composición, en donde una disminución en la actividad de GDF6 en presencia del compuesto, con relación a un control adecuado, identifica el compuesto como uno que disminuye la actividad de GDF6.

45 La inhibición de al menos una actividad de GDF6 puede comprender la apoptosis de una célula de melanoma y puede comprender reducir la señalización corriente abajo de un receptor de BMP con el que interactúa GDF6 cuando se compara con un control adecuado. La reducción de la señalización corriente abajo de un receptor de BMP puede comprender la reducción de la fosforilación de SMAD1/5/8. El compuesto de prueba puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico antisentido, un polipéptido de receptor soluble y una molécula pequeña. El ácido nucleico antisentido puede seleccionarse del grupo que consiste en un ARNi, una ribozima, una 50 molécula de ácido nucleico α -anomérico y un ácido nucleico peptídico; y el ARNi puede comprender un ARNip o un ARNsh. El polipéptido de receptor soluble puede ser un polipéptido de ALK3 soluble, tal como la fusión ALK3(24-152)-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.

55 Un tercer aspecto describe un método de ensayo de detección para identificar un compuesto que disminuye una actividad de GDF6, que comprende

- 60 (a) proporcionar un sujeto que comprende al menos una célula de melanoma; (b) administrar al sujeto un compuesto de prueba; y (c) determinar un efecto del compuesto de prueba sobre una actividad de GDF6 en el sujeto, en donde una disminución en la actividad de GDF6 en presencia del compuesto, con relación a un control adecuado, identifica el compuesto como uno que disminuye la actividad de GDF6. La inhibición de al menos una actividad de GDF6 puede comprender la apoptosis de una célula de melanoma y puede comprender reducir la señalización corriente abajo de un receptor de BMP con el que interactúa GDF6 cuando se compara con un control adecuado. La reducción de la señalización corriente abajo de un receptor de BMP puede comprender la reducción de la fosforilación de SMAD1/5/8. El compuesto de prueba puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido 65 nucleico antisentido, un polipéptido de receptor soluble y una molécula pequeña. El ácido nucleico antisentido puede seleccionarse del grupo que consiste en un ARNi, una ribozima, una molécula de ácido nucleico α -anomérico y un ácido

nucleico peptídico; y el ARNi puede comprender un ARNip o un ARNsh. El polipéptido de receptor soluble puede ser un polipéptido de ALK3 soluble, tal como la fusión ALK3(24-152)-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.

5 Tanto en el segundo como en el tercer aspecto descritos en la presente descripción también se describe el uso del compuesto identificado en el segundo y en el tercer aspecto para tratar un melanoma en un sujeto. El sujeto puede ser un mamífero no humano o un ser humano.

10 Un cuarto aspecto describe un método para inhibir la formación de melanoma en un sujeto en riesgo de formación de melanoma, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de una actividad de GDF6. El sujeto puede ser un mamífero no humano o un ser humano. La inhibición de al menos una actividad de GDF6 puede comprender la apoptosis de una célula de melanoma y puede comprender reducir la señalización corriente abajo de un receptor de BMP con el que interactúa GDF6 cuando se compara con un control adecuado. La reducción de la señalización corriente abajo de un receptor de BMP puede comprender la reducción de la fosforilación de SMAD 1/5/8. El compuesto de prueba puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico antisentido, un polipéptido de receptor soluble y una molécula pequeña. El ácido nucleico antisentido puede seleccionarse del grupo que consiste en un ARNi, una ribozima, una molécula de ácido nucleico α -anomérico y un ácido nucleico peptídico; y el ARNi puede comprender un ARNip o un ARNsh. El polipéptido de receptor soluble puede ser un polipéptido de ALK3 soluble, tal como la fusión ALK3(24-152)-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.

20 En un quinto aspecto, la invención se dirige a un método para tratar un melanoma en un sujeto, que comprende
 (a) obtener una muestra de un área sospechosa de la piel del sujeto;
 (b) determinar la presencia de GDF6;
 (c) obtener un control adecuado;
 25 (d) comparar la presencia de GDF6 en la muestra de la etapa (b) con el control adecuado de la etapa (c);
 (e) determinar si el sujeto presenta un melanoma, en donde la presencia de GDF6 en la muestra pero no en el control adecuado indica melanoma; y
 (f) tratar al sujeto con un inhibidor de GDF6 para inhibir GDF6 si el sujeto tiene melanoma. El sujeto puede ser un mamífero no humano o un ser humano. La inhibición de la actividad de GDF6 puede provocar la apoptosis de una célula de melanoma y puede reducir la señalización corriente abajo de un receptor de BMP con el que interactúa GDF6 en comparación con un control adecuado. La reducción de la señalización corriente abajo de un receptor de BMP puede reducir la fosforilación de SMAD1/5/8. El compuesto de prueba puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico antisentido, un polipéptido de receptor soluble y una molécula pequeña. El ácido nucleico antisentido puede seleccionarse del grupo que consiste en un ARNi, una ribozima, una molécula de ácido nucleico α -anomérico y un ácido nucleico peptídico; y el ARNi puede comprender un ARNip o un ARNsh. El polipéptido de receptor soluble puede ser un polipéptido de ALK3 soluble, tal como la fusión ALK3(24-152)-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.

40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que el ARNm de *GDF6* está presente a niveles más altos en melanomas humanos en comparación con los melanocitos normales. Cada punto de datos representa la expresión normalizada de GDF6 en una muestra de melanocitos individual o melanoma derivado del paciente. Los valores de expresión normalizados se obtuvieron mediante el análisis de datos de secuenciación de ARN masivamente paralelos disponibles públicamente.

45 La Figura 2 muestra que el homólogo de *GDF6* de pez cebra *gdf6b*, se expresa a niveles más altos en melanomas en comparación con los melanocitos normales. Se indican los promedios de los valores de expresión normalizados ($\pm$ SEM). La PCR cuantitativa se realizó en tres muestras de melanoma y tres de melanocitos, que se promediaron, respectivamente.

50 La Figura 3 muestra que la sobreexpresión de *gdf6b* provoca la aceleración del inicio del melanoma en el pez cebra. Los melanocitos que expresaban el homólogo de *GDF6* *gdf6b* o *EGFP* se reconstituyeron en un fondo *BRAFV600E*-positivo y *p53*-negativo. Los peces transgénicos se monitorearon semanalmente para determinar el tiempo de inicio del melanoma. Los tumores que expresan *gdf6b* surgieron antes que los que expresan *EGFP*.

55 Las Figuras 4A-4D muestran que la atenuación de *GDF6* reduce la proliferación celular del melanoma in vitro. La Figura 4A muestra una transferencia Western que indica la atenuación de la proteína GDF6 mediada por ARNsh (carriles direccionamiento de "shGDF6#1" (SEQ ID NO:1; las secuencias SEQ ID NO:1-7 pueden encontrarse en la Figura 11) y "shGDF6#2" (que se dirige a la SEQ ID NO:2)) en comparación con un control de vinculina en células de melanoma A375, así como también en comparación con células tratadas con *EGFP* (que se dirige a la SEQ ID NO:3) (carril "shGFP"). Las Figuras 4B-4D muestran ensayos de crecimiento clonogénico de células de control tratadas con ARNsh que se dirige a *EGFP* (Figura 4B) y células tratadas con ARNsh que se dirigen a *GDF6* (Figura 4C, tratadas con shGDF6#1, y Figura 4D, tratadas con shGDF6#2). La tinción con violeta cristalino indica muchas menos colonias en placas tratadas con ARNsh que se dirigen a GDF6 (Figuras 4C y 4D).

60 Las Figuras 5A-5D muestran que la atenuación de *SMAD1* reduce la proliferación celular del melanoma in vitro. La Figura 5A muestra una transferencia Western que indica la atenuación de la proteína SMAD1 mediada por ARNsh (carriles "shSMAD1-1" (que se dirige a la SEQ ID NO:4) y "shSMAD1-2" (que se dirige a la SEQ ID NO:5) en comparación con un control de vinculina en células de melanoma A375, así como también en comparación con células tratadas con *EGFP* (SEQ ID NO:3) (carril "shGFP"). Las Figuras 5B-5D muestran ensayos de crecimiento clonogénico

de células de control tratadas con ARNsh que se dirige a *EGFP* (Figura 5B) y células tratadas con ARNsh que se dirigen *SMAD1* (Figura 5C, tratada con shSMAD1-1, y Figura 5D, tratada con shSMAD1-2). La tinción con cristal violeta indica muchas menos colonias en placas tratadas con ARNsh que se dirige a *SMAD1/5/8*. La atenuación de *SMAD1/5/8* muestra el mismo fenotipo que la atenuación de *GDF6*, lo que sugiere que *GDF6* puede estar actuando a través de *SMAD1/5/8* para regular la proliferación de células de melanoma.

Las Figuras 6A-6B muestran que la atenuación de *GDF6* provoca el aumento de la apoptosis de células de melanoma. Las células de melanoma A375 se trataron con ARNsh que se dirigen a *GDF6* (tratadas con shGDF6-1 (que se dirige a la SEQ ID NO:1) y sh-GDF6-2 (que se dirige a la SEQ ID NO:2)) o un ARNsh que se dirige a *EGFP* de control (que se dirige a la SEQ ID NO:3) (shGFP). Las células atenuadas se monitorizaron por la tinción con Anexina 5 (Figura 6A) y la escisión de Caspasa 3/7 (Figura 6B), los cuales son marcadores de la apoptosis. La atenuación de *GDF6* provocó una elevada apoptosis con relación a las células de control.

Las Figuras 7A-7B muestran que la atenuación de *SMAD1/5/8* provoca el aumento de la apoptosis de células de melanoma. Las células de melanoma A375 se trataron con ARNsh que se dirigen a *SMAD1/5/8* (tratadas con shSMAD1-1 (que se dirige a la SEQ ID NO:4) y shSMAD1-2 (que se dirige a la SEQ ID NO:5) o un ARNsh que se dirige a *EGFP* de control (que se dirige a la SEQ ID NO:3) (shGFP). Las células atenuadas se monitorizaron por la tinción con Anexina 5 (Figura 7A) y la escisión de Caspasa 3/7 (Figura 7B), los cuales son marcadores de la apoptosis. La atenuación de *SMAD1/5/8* provocó una elevada apoptosis con relación a las células de control.

Las Figuras 8A-8C muestran que la inhibición de la señalización de la vía BMP afecta el crecimiento de células de melanoma. Las células de melanoma A375 se trataron con DMH1 10 µM, un inhibidor de la vía BMP, o con medios de control que carecían de este inhibidor. La Figura 8A muestra una transferencia Western que muestra una reducción en la señalización de BMP (carril A375 DMH1 10 µM), como se indica por un nivel reducido de fosfo-SMAD1 con relación a la proteína SMAD total. Las Figuras 8B y 8C muestran las curvas de crecimiento de células de melanoma A375 y SKMEL28 tratadas con DMH1 según se mide por recuento celular directo. Las células tratadas con DMH1 crecieron más lentamente que las células de control.

La Figura 9 muestra que la atenuación de *GDF6* reduce el crecimiento del melanoma in vivo. Las células de melanoma A375 se trataron con un ARNsh que se dirige a *GDF6* (shGDF6#2, que se dirige a la SEQ ID NO:2) o un ARNsh que dirige a *EGFP* de control (shGFP, que se dirige a la SEQ ID NO:3). Las células atenuadas se xenotrasplantaron en ratones desnudos, y se monitoreó el volumen tumoral. Las células sometidas a *GDF6* atenuado formaron tumores más lentamente que las células de control.

La Figura 10 muestra que después de la atenuación de *GDF6*, la proliferación de las células de melanoma puede restaurarse mediante la suplementación de los medios con proteína GDF6 recombinante. Las células de melanoma MeWo se trataron con ARNsh que se dirigen a *GDF6* (shGDF6#1, en este caso que se dirige a la SEQ ID NO:6 y shGDF6#2, en este caso que se dirige a la SEQ ID NO:7) o un ARNsh que se dirige a *EGFP* de control (shGFP, que se dirige a la SEQ ID NO:3). Cuando se añadió la proteína GDF6 recombinante a medios de cultivo, se restauró la proliferación de células con atenuación de *GDF6*. Estos datos indican que GDF6 puede actuar como una proteína extracelular y soluble para promover el crecimiento de las células de melanoma.

La Figura 11 muestra las secuencias para las SEQ ID NO:1-7.

Las Figuras 12A y 12B muestran que la sobreexpresión de *GDF6* acelera la formación de melanoma en xenoinjertos de ratón. La Figura 12A muestra que la expresión de *GDF6* está regulada (carril derecho, "Lenti CMV GDF6") en comparación con el vector vacío (carril izquierdo, "Lenti CMV vacío"); también se muestra la expresión de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La Figura 12B muestra que cuando se sobreexpresa GDF6, la formación de melanoma se acelera (cuadrados) en comparación con las células de control que contienen el vector vacío (círculos).

Las Figuras 13A-13C muestran que la sobreexpresión de *GDF6* reduce los niveles basales de muerte celular en xenoinjertos de melanoma de ratón. La Figura 13A muestra la cuantificación de la tinción de tejido en xenoinjertos de melanoma de ratón mediante el uso de tinción TUNEL, mientras que la Figura 13B muestra la cuantificación de la tinción de tejido en xenoinjertos de melanoma de ratón para caspasa 3 escindida ("Vacío" significa células transfectadas con vector vacío, mientras que "GDF6" indica células transfectadas con *GDF6* para sobreexpresar *GDF6*). La Figura 13C muestra que los melanomas con sobreexpresión ortóloga de *GDF6* se correlacionan negativamente con una firma proapoptótica.

Las Figuras 14A-14D muestran que la atenuación de cualquiera de *GDF6* o *SMAD1* anula el crecimiento de melanoma en xenoinjertos de ratón *in vivo*. La Figura 13A muestra que el uso del ARNsh que se dirige a *GDF6* (shGDF6#1 y shGDF6#2) disminuye la expresión de la proteína GDF6 en comparación con las células de control (tratadas con shGFP), mientras que no tiene un efecto sobre la expresión de un control interno, GAPDH. La Figura 13B muestra que los volúmenes tumorales en los xenoinjertos disminuyen con el grado de atenuación de *GDF6*. shEGFP, círculos; shGDF6#1, cuadrados; shGDF6#2, triángulos. La Figura 13C muestra que el uso del ARNsh que se dirige a *SMAD1* (shSMAD1#1 y shSMAD1#2) disminuye la expresión de la proteína SMAD1 en comparación con las células tratadas con ARNsh de control (shGFP); el tratamiento con shARN de *GDF6* no tuvo un efecto sobre la expresión de un control interno, GAPDH en comparación con GAPDH expresado en células tratadas con control. La Figura 13D muestra que los volúmenes tumorales en los xenoinjertos disminuyen cuando se inhibe la expresión de *SMAD1*. shEGFP, círculos; shSMAD1#1, cuadrados.

Las Figuras 15A y 15B muestran que la atenuación de *GDF6* induce la muerte celular en xenoinjertos de melanoma de ratón *in vivo*. La Figura 15A muestra el porcentaje de células teñidas por la técnica TUNEL cuando se atenúa la expresión de *GDF6* (shGDF6#1) en comparación con las células transfectadas con el ARNsh de control, shGFP. La Figura 15B muestra el porcentaje de células teñidas para caspasa 3 escindida cuando se atenúa la expresión de *GDF6* (shGDF6#1) en comparación con las células transfectadas con el ARNsh de control, shGFP.

Las Figuras 16A-16D muestran que la expresión de un fosfomimético de *SMAD1* (*SMAD1DVD*) puede rescatar el potencial clonogénico de las células de melanoma después de la atenuación de *GDF6* *in vitro* e *in vivo*. La Figura 16A muestra la expresión de un fosfomimético de *SMAD1* etiquetado con FLAG (Lenti CMV Flag-*SMAD1DVD*) en comparación con las células de control de vector vacío (Lenti CMV Vacío); también se muestra la expresión de GAPDH. La Figura 16B muestra el número relativo de colonias formadas en un ensayo clonogénico aplicado a células de control y células que expresan fosfomiméticos de *SMAD1* tratadas con los ARNsh indicados. "Vacías" significa células transfectadas con un vector vacío y después tratadas con los ARNsh mostrados. "DVD" significa células transfectadas con el fosfomimético de *SMAD1* y después tratadas con los ARNsh mostrados. La Figura 16C muestra el volumen tumoral en melanomas de xenoinjerto en ratones en el tiempo, comparando las células tratadas con "DVD-shGFP" con las tratadas con "DVD-shGFP". La Figura 16D también muestra el volumen tumoral en melanomas de xenoinjerto en ratones en el tiempo, comparando "Vacío-shGDF6#1" (círculos más claros, línea continua), "DVD-shGDF6#1" (círculos más claros, línea discontinua), "Vacío-shGDF6#2" (círculos más oscuros, línea continua) y "DVD-shGDF6#2" (círculos más oscuros, línea discontinua).

La Figura 17 muestra que un inhibidor de molécula pequeña de la vía BMP, DMH1, anula el crecimiento del melanoma en xenoinjertos de ratón *in vivo* según lo evaluado por los volúmenes tumorales en el tiempo. Círculos, solo vehículo; cuadrados, inhibidor de DMH1.

La Figura 18 muestra que la expresión de *GDF6* se correlaciona con la pobre supervivencia del paciente con melanoma.

Las Figuras 19A-19I muestran que *GDF6* se amplifica y, junto con la señalización de BMP, se regula positivamente en melanomas. La Figura 19A muestra los CNV de melanomas de pez cebra en 25 cromosomas. Se muestran las puntuaciones G de JISTIC (rojo pálido = amplificaciones; azul pálido = deleciones) y los valores Q transformados en $-\log_{10}$ (valor Q $\leq 0,25$; líneas en negrita). Los círculos puntuados representan el valor Q transformado en $-\log_{10}$ de 0 (centro) y 11 (externo: amplificación; interno: deleción). La Figura 19B muestra genes ortólogos amplificados significativamente en melanomas humanos y de pez cebra (de 10 380 pares de genes de pez cebra-humano; prueba hipergeométrica, valor P: $2,0e^{-15}$). La Figura 19C muestra los cambios en veces transformados en $\log_2$ de genes regulados positivamente en melanomas de pez cebra en comparación con los melanocitos. Se indican los genes ortólogos amplificados de forma recurrente en el pez cebra y los melanomas humanos (rojo). Se indican *gdf6a* y *gdf6b* (puntos grandes). La Figura 19D muestra secciones transversales de un *Tg(mitfa:BRAF(V600E));pez cebra p53^{-/-}* que porta un melanoma invasivo en la musculatura dorsal. Parte superior, tinción con hematoxilina y eosina (T, tumor; N, tejido normal). Parte intermedia, tinción de fosfo-SMAD1/5/8. Parte inferior, tinción con GDF6. Izquierda, barra de escala, 500 μ m. Derecha, barra de escala, 50 μ m. La Figura 19E muestra un mapa de calor de la expresión génica de la ruta BMP en melanomas de pez cebra en comparación con melanocitos. Se enumeran los ortólogos humanos de genes de peces. La Figura 19F muestra el cambio en veces transformado en $\log_2$ de la expresión del ligando BMP en melanomas de pez cebra en comparación con melanocitos (valor $p < 0,05$). La Figura 19G muestra la inmunotinción de *Tg(mitfa:BRAF(V600E));escamas de pez cebra p53^{-/-}* que portan células de melanoma (parte superior) o melanocitos normales (parte inferior). Se muestran DAPI (azul), Gdf6 (verde), Mitfa (rojo) y una imagen fusionada de todos los canales. Barra de escala, 10 μ m. La Figura 19H, izquierda, muestra un mapa de calor que muestra el número de copias del locus de *GDF6* humano en 111 melanomas humanos (eje y). Derecha, mapa de calor que muestra el número de copias del locus de *gdf6b* de pez cebra en 38 melanomas de pez cebra (eje y). El rojo indica amplificación, el azul indica deleción. La Figura 19I muestra el cambio en veces transformado en $\log_2$ de la expresión de *gdf6a* y *gdf6b* en melanomas de pez cebra en comparación con melanocitos (eje y) según se determina por qRT-PCR.

Las Figuras 20A-20K muestran que la modulación de *GDF6* afecta el crecimiento y la supervivencia de las células de melanoma. La Figura 20A muestra las curvas de supervivencia sin melanoma de *Tg(mitfa:BRAF(V600E));pez cebra p53^{-/-};mitfa^{-/-}* injectado con miniCoopR-*gdf6b* o miniCoopR-EGFP ($P = 0,02$, análisis de rangos logarítmicos de Mantel-Cox). La Figura 20B muestra inmunotransferencias de células de melanoma A375 que sobreexpresan *GDF6*. La Figura 20C muestra un ensayo en agar blando con células A375 que sobreexpresan *GDF6* o control vectorial vacío. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 20D muestra la formación de tumores en ratones injectados con células A375 que sobreexpresan *GDF6* o control vectorial vacío. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 20E muestra inmunotransferencias de células de melanoma A375 que expresan *shEGFP*, *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. La Figura 20F muestra un ensayo de formación de colonias con células A375 que expresan *shEGFP*, *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 20G muestra la formación de tumores en ratones injectados con células A375 que expresan *shEGFP*, *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 20H muestra una representación gráfica de la lista de genes ordenados por rango estratificada en función de la expresión en células de melanoma A375 que sobreexpresan *GDF6* en comparación con el control vectorial vacío. Con GSEA, un conjunto de genes apoptóticos se enriquece negativamente en melanomas que sobreexpresan *GDF6*. ES, puntaje de enriquecimiento, NES, puntaje de enriquecimiento normalizado. La Figura 20I muestra la actividad de caspasa3/7 en células A375 que expresan *shEGFP*, *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. RLU, unidades relativas de luciferasa. La Figura 20J muestra la tinción TUNEL de xenoinjertos de ratón de células A375 que expresan *shEGFP* o *shGDF6.1*. Barra de escala, 25 μ m. Las barras de error indican s.e.m; $n=100$ campos. La Figura 20K muestra la tinción TUNEL de xenoinjertos de ratón de células A375 con un vector vacío (parte superior) o con sobreexpresión de *GDF6* (parte inferior). Barra de escala, 100 μ m (izquierda), 25 μ m (derecha). Las barras de error indican s.e.m; $n=100$ campos. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba-t de Student de dos colas, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$.

Las Figuras 21A-21H muestran los efectos de modulación de *GDF6* en el crecimiento celular de melanoma A375 y la supervivencia. La Figura 21A muestra curvas de crecimiento de células A375 que sobreexpresan *GDF6* o control vectorial vacío. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 21B, izquierda, muestra imágenes representativas

del ensayo de formación de colonias con células A375 que sobreexpresan *GDF6* o control vectorial vacío. La Figura 21B, derecha, muestra la cuantificación del ensayo de formación de colonias. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. (C) Curvas de crecimiento de células A375 que expresan *shEGFP*, *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 21D muestra una representación gráfica de la lista de genes ordenados por rango estratificada en función de la expresión en células A375 que expresan *shGDF6.1* en comparación con las células A375 de control que expresan *shEGFP*. GSEA indica que la expresión de un conjunto de genes apoptóticos se enriquece tras la atenuación de *GDF6*. La Figura 21E muestra el análisis de citometría de flujo de la positividad a anexina V de células A375 que expresan *shEGFP*, *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 21F muestra tumores teñidos con caspasa3 escindida de xenoinjertos de ratón de células A375 que expresan *shEGFP* (parte superior) o *shGDF6.1* (parte inferior). Barra de escala, 25 μ m. Las barras de error indican s.e.m; $n=100$ campos. La Figura 21G muestra tumores teñidos con caspasa3 escindida de xenoinjertos de ratón de células A375 con vector vacío (parte superior) o con sobreexpresión de *GDF6* (parte inferior). Barras de escala, 100 μ m (izquierda), 25 μ m (derecha). Las barras de error indican s.e.m; $n=100$ campos. La Figura 21H muestra tumores teñidos con Ki67 de xenoinjertos de ratón de células A375 que sobreexpresan *GDF6* o control vectorial vacío. Barra de escala, 25 μ m. Prueba-*t* de Student de dos colas, valor $P<0,001$; $n=100$ campos. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba-*t* de Student de dos colas, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$.

Las Figuras 22A-22E muestran los efectos de la modulación de *GDF6* en el crecimiento y supervivencia celular de melanoma SK-MEL-28 y MeWo. La Figura 22A muestra inmunotransferencias de células de melanoma SK-MEL-28 (parte superior) y células de melanoma MeWo (parte inferior) que expresan *shEGFP* o *shGDF6.2*. La Figura 22B muestra el ensayo de formación de colonias con células SK-MEL-28 que expresan *shEGFP* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 22C muestra el ensayo de formación de colonias con células MeWo que expresan *shEGFP* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 22D muestra la actividad de caspasa3/7 en células SK-MEL-28 (izquierda) y células MeWo (derecha) que expresan *shEGFP* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. RLU, unidades relativas de luciferasa. La Figura 22E muestra el análisis de citometría de flujo de positividad a anexina V de células SK-MEL-28 (izquierda) y células MeWo (derecha) que expresan *shEGFP* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba-*t* de Student de dos colas, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$.

Las Figuras 23A-23H muestra que *GDF6* actúa a través de *SMAD1* para promover la supervivencia celular del melanoma y modular la expresión del gen de la cresta neural. La Figura 23A muestra inmunotransferencias de células de melanoma A375 que expresan *shEGFP*, *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. La Figura 23B muestra la formación de tumores en ratones inyectados con células A375 que expresan *shEGFP* o *shSMAD1.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 23C muestra la formación de tumores de células A375 en ratones tratados con control de vehículo o 25 mg/kg de DMH1 cada dos días. Las barras de error indican s.e.m; $n=8$. La Figura 23D, izquierda, muestra la formación de tumores en ratones inyectados con células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan *shEGFP*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 23D, derecha, muestra la formación de tumores en ratones inyectados con células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 23E muestra la actividad de caspasa3/7 en células con A375-VACÍO y A375-*SMAD1DVD* que expresan *shEGFP* o *shGDF6.1*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. RLU, unidades relativas de luciferasa. La Figura 23F muestra la tinción TUNEL de xenoinjertos de ratón de células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan *shEGFP* o *shGDF6.1*. Barra de escala, 25 μ m. Las barras de error indican s.e.m; $n=100$ campos. La Figura 23G, parte superior, muestra genes regulados de manera diferencial entre células con A375-VACÍO que expresan *shEGFP* y células con A375-VACÍO que expresan *shGDF6.1* (círculo morado) y genes que se regulan recíprocamente de manera diferencial entre las células con A375-VACÍO que expresan *shGDF6.1* y células A375-*SMAD1DVD* que expresan *shGDF6.1* (círculo verde). La Figura 23G, parte inferior, muestra el análisis de la ruta con genes regulados recíprocamente (superposición mínima ≥ 10 genes; P -valor ajustado $<0,01$). La Figura 23H muestra un mapa de calor de la expresión del gen de la cresta neural identificada en el análisis de la vía. Los genes esenciales para la supervivencia de las células de la cresta neural y sus derivados están en morado. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba-*t* de Student de dos colas, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$. ns, no significativo.

La Figura 24 muestra que la modulación de *GDF6* y *SMAD1* altera la expresión de los objetivos de la vía BMP *ID1* e *ID3*. qRT-PCR que muestra la expresión relativa de *ID1* (izquierda) y *ID3* (derecha) en células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan un ARNsh que se dirige a *EGFP* o dos ARNshs dirigidos a *GDF6* independientes. Se realizó la normalización a valores de expresión de células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan un ARNsh que se dirige a *EGFP*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba-*t* de Student de dos colas, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$.

Las Figuras 25A-25G muestran que la modulación de *SMAD1* afecta el crecimiento y la supervivencia celular de melanoma A375. La Figura 25A muestra inmunotransferencias de células de melanoma A375 que expresan *shEGFP*, *shSMAD1.1* o *shSMAD1.2*. La Figura 25B muestra las curvas de crecimiento de células A375 que expresan *shEGFP*, *shSMAD1.1* o *shSMAD1.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 25C muestra un ensayo de formación de colonias con células A375 que expresan *shEGFP*, *shSMAD1.1* o *shSMAD1.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 25D muestra el análisis de citometría de flujo de positividad a anexina V de células A375 que expresan *shEGFP*, *shSMAD1.1* o *shSMAD1.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 25E muestra la actividad de caspasa3/7 en células A375 que expresan *shEGFP*, *shSMAD1.1* o *shSMAD1.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. RLU, unidades relativas de luciferasa. La Figura 25F muestra la tinción TUNEL de xenoinjertos de ratón de células A375 que expresan *shEGFP* (parte superior) o *shSMAD1.2* (parte inferior). Barra de escala, 25 μ m. Las barras de error indican s.e.m; $n=100$ campos. La Figura 25G muestra la tinción de caspasa3 escindida de xenoinjertos de ratón de células A375 que expresan *shEGFP* (parte superior) o *shSMAD1.2* (parte inferior). Barra de escala, 25 μ m. Las

barras de error indican s.e.m; $n=100$ campos. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba- t de Student de dos colas, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$.

Las Figuras 26A-26D muestran que la variante de *SMAD1DVD* activada rescata los efectos de pérdida de *GDF6* en células de melanoma A375. La Figura 26A muestra inmunotransferencias de células A375 que sobreexpresan *SMAD1DVD* etiquetado con Flag. La Figura 26B muestra el ensayo de formación de colonias de células con A375-VACÍO (parte superior) o A375-*SMAD1DVD* (parte inferior) que expresan *shEGFP*, *shGDF6.1* o *shGDF6.2*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 26C muestra el análisis de citometría de flujo de positividad a anexina V de células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan *shEGFP* o *shGDF6.1*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 26D muestra la tinción por caspasa3 escindida de xenoinjertos de ratón de células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan *shEGFP* o *shGDF6.1*. Barra de escala, 25 μ m. Las barras de error indican s.e.m; $n=100$ campos. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba- t de Student de dos colas, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$.

Las Figuras 27A-27D muestran que el inhibidor de la vía BMP DMH1 inhibe el crecimiento celular de melanoma A375. La Figura 27A muestra inmunotransferencias de células de melanoma A375 tratadas con DMSO al 0,1 % (vehículo) o DMH1 10 μ M en DMSO al 0,1 %. La Figura 27B muestra las curvas de crecimiento de células A375 tratadas con DMSO al 0,1 % (vehículo) o DMH1 10 μ M en DMSO al 0,1 %. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 27C muestra un ensayo de formación de colonias de células A375 tratadas con DMSO al 0,1 % (vehículo) o DMH1 10 μ M en DMSO al 0,1 %. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. La Figura 27D muestra un ensayo de formación de colonias con células con A375-VACÍO y A375-*SMAD1DVD* tratadas con DMSO al 0,1 % (vehículo) o DMH1 10 μ M en DMSO al 0,1 %. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba- t de Student de dos colas, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$.

La Figura 28 muestra que la atenuación de *GDF6* y *SMAD1DVD* altera la expresión de genes importantes para la supervivencia de las células de la cresta neural y sus derivados. Los valores relativos de FPKM de ARN-seq que muestra la expresión de genes implicados en la supervivencia de las células de la cresta neural y sus derivados en células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan un ARNsh que se dirige a *EGFP* o el ARNsh dirigido a *GDF6* *GDF6.1*. Se realizó la normalización a valores de FPKM de células con A375-VACÍO o A375-*SMAD1DVD* que expresan un ARNsh que se dirige a *EGFP*. De nota, *DIDO1*, una diana de BMP que puede promover la supervivencia de las células de melanoma no fue regulado de manera diferencial por la modulación de *GDF6* o *SMAD1*. Las barras de error indican s.e.m; $n=3$. Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba- t de Student de dos colas, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$.

Las Figuras 29A-29F muestran la expresión de *GDF6* y la importancia pronóstica en melanomas derivados de paciente. La Figura 29A muestra los valores FPKM del transcrito *GDF6* de melanocitos y melanomas humanos normales. La Figura 29B muestra la representación gráfica de la lista de genes ordenados por rango estratificada en función de los niveles de expresión de *GDF6* en melanomas derivados del paciente (TCGA). Por GSEA, un conjunto de genes apoptóticos se correlaciona negativamente con la expresión de *GDF6* en melanomas derivados de paciente. La Figura 29C muestra la tinción de secciones normales adyacentes de piel y melanoma. Parte superior, hematoxilina y eosina. Parte intermedia, inmunotinción de *GDF6*. Se indican los melanocitos en secciones normales de la piel (puntas de flecha). Barra de escala, 25 μ m. Las imágenes de las células individuales se muestran más abajo. Parte inferior, porcentajes de muestras de pacientes con expresión nula o baja, y alta de *GDF6* en melanocitos y melanomas normales. La Figura 29D muestra la tinción de secciones normales adyacentes de piel y melanoma. Parte superior, hematoxilina y eosina. Parte intermedia, inmunotinción de fosfo-SMAD 1/5/8. Se indican los melanocitos en secciones normales de la piel (puntas de flecha). Barra de escala, 25 μ m. Las imágenes de las células individuales se muestran más abajo. Parte inferior, porcentajes de muestras de pacientes con expresión nula o baja y alta de fosfo-SMAD 1/5/8 en melanocitos y melanomas normales. La Figura 29E, parte superior, muestra los porcentajes de muestras de pacientes con expresión de *GDF6* nula o poca y alta en el micromatriz de tejido de melanoma. La Figura 29E, parte inferior, muestra las curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia general de pacientes con expresión de *GDF6* nula o baja (línea azul) frente a la expresión de *GDF6* alta (línea roja). El análisis estadístico se realizó con una prueba de rango log de Mantel-Cox. La Figura 29F muestra un esquema que muestra la amplificación de locus y la expresión de *GDF6*. *GDF6* actúa a través de la señalización de BMP-SMAD1 para promover la supervivencia de las células de melanoma. Los niveles de *GDF6* y la señalización de BMP modulan el crecimiento tumoral.

La Figura 30 muestra la expresión de *GDF6* y p-SMAD1/5/8 en una sección de melanoma del paciente. Secciones de un melanoma humano metastásico con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). Parte superior, tinción con hematoxilina y eosina. Parte intermedia, tinción de *GDF6*. Parte inferior, tinción de fosfo-SMAD 1/5/8. Izquierda, bajo aumento. Barra de escala, 50 μ m. Centro, región del melanoma y, derecha, región TIL. Barra de escala, 25 μ m.

Descripción detallada

En la búsqueda de oncogenes de melanoma, los inventores descubrieron que la proteína morfogenética ósea (BMP) *GDF6* juega un papel importante en el inicio y mantenimiento del melanoma. *GDF6* (también conocida como BMP13), un miembro de la superfamilia de proteínas TGF-beta, es un factor secretor que se conoce que está involucrado en el desarrollo y la reparación del esqueleto. La mutación de pérdida de función en *GDF6*, y sus parálogos *GDF5* y *GDF7*, se asocia con enfermedades esqueléticas raras, incluido el síndrome de Klippel-Feil (Storm y otros, (1994) Nature 369:639-643; Wolfman y otros, (1997) J Clin Invest 100:321-330; Aspenberg y Forslund (1999) Acta Orthop Scand 70:51-54; Tassabehji y otros, (2008) Hum Mutat 29:1017-1027). En estudios con animales, se ha demostrado que *GDF6* está involucrado en el desarrollo retiniano y esquelético (Sidi y otros, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 18:3315-20; Settle (2003) Dev Biol 254:116-1130; Hanel y Hensey (2006) BMC Dev Biol 6:43)).

El gen *GDF6* se amplifica recurrentemente en melanomas humanos, y la proteína GDF6 se expresa altamente en casi todos los melanomas. La atenuación de GDF6 conduce a la apoptosis de las células de melanoma en cultivo, y los melanomas xenotrasplantados con GDF6 inactivado crecen poco en comparación con los xenotransplantes de control. El GDF6 es una proteína secretada, y el GDF6 proporcionado exógenamente permite que las células con atenuación de GDF6 sobrevivan. Por último, las células normales no transformadas con atenuación de GDF6 sobreviven sin mostrar efectos adversos. Tomados en conjunto, los datos de los inventores indican que las células de melanoma producen GDF6 para permitir su propia supervivencia. Esta señalización a favor de la supervivencia es específica del tumor ya que los melanocitos normales no expresan GDF6, y las células normales que expresan GDF6 son insensibles a la atenuación de GDF6. Estos datos identifican a GDF6 como una diana farmacológica atractiva, ya que podría predecirse que las terapias que se dirigen a GDF6 matarían selectivamente las células de melanoma.

GDF6 tiene características distintivas de ser un importante gen de melanoma. Es un número de copia amplificado y altamente expresado en tumores pero no en tejido normal. Es suficiente para acelerar la aparición del melanoma, y su atenuación detiene la proliferación de células de melanoma. Todas las líneas celulares de melanoma y la mayoría de las muestras tumorales analizadas hasta la fecha muestran la expresión de GDF6, por lo que una gran fracción de melanomas puede ser dirigida por la terapia anti-GDF6. Además, el locus de *GDF6* se amplifica de forma recurrente en los cánceres de mama, ovario y neural, y puede probarse que el GDF6 también puede ser una diana viable en estos tipos de tumores. La forma madura de GDF6 es un ligando extracelular soluble, por lo que las terapias tales como el enfoque propuesto basado en anticuerpos no necesitarían ingresar a las células para dirigirlo.

Para que la invención pueda ser más fácilmente comprendida, ciertos términos se definen primero.

Definiciones:

Una "molécula relacionada con melanoma", como se usa en la presente descripción, significa una molécula de GDF6 y una molécula de la vía de señalización BMP, tal como SMAD1/5/8 o quinasa-3 similar a receptor de activina (ALK3).

Varias metodologías de la presente invención incluyen etapas que implican comparar un valor, nivel, elemento, característica, propiedad, etc. con un "control adecuado", denominado indistintamente en la presente descripción un "control apropiado". Un "control adecuado" o "control apropiado" es cualquier control o estándar familiar para un experto en la técnica útil para fines de comparación. En una modalidad, un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, elemento, característica, propiedad, etc. determinado antes de realizar una metodología, como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, puede determinarse una tasa de transcripción, nivel de ARNm, tasa de traducción, nivel de proteína, actividad biológica, característica o propiedad celular, genotipo, fenotipo, etc. antes de realizar una metodología. En otra modalidad, un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, elemento, característica, propiedad, etc., determinado en una célula u organismo, por ejemplo, una célula u organismo de control o normal, que exhibe, por ejemplo, rasgos normales. Aún en otra modalidad, un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, elemento, característica, propiedad predefinidos, etc.

La expresión "poner en contacto" (es decir, poner en contacto una célula, por ejemplo, una célula, con un compuesto) incluye incubar el compuesto y la célula juntos in vitro (por ejemplo, al añadir el compuesto a las células en cultivo), así como también administrar el compuesto a un sujeto de manera que el compuesto y las células del sujeto se ponen en contacto in vivo. El término "contacto" no incluye la exposición de las células a un modulador de molécula relacionada con melanoma que puede ocurrir naturalmente en un sujeto (es decir, la exposición que puede ocurrir como resultado de un proceso fisiológico natural).

Como se usa en la presente descripción, la expresión "compuesto de prueba" se refiere a un compuesto que no se ha identificado previamente como, o reconocido como, un modulador de la actividad que se prueba. La expresión "biblioteca de compuestos de prueba" se refiere a un panel que comprende una multiplicidad de compuestos de prueba.

Se describe que pueden usarse moléculas pequeñas como compuestos de prueba. La expresión "molécula pequeña" es un término de la técnica e incluye moléculas que tienen menos de aproximadamente 7500, menos de aproximadamente 5000, menos de aproximadamente 1000 de peso molecular o menos de aproximadamente 500 de peso molecular. En una modalidad, las moléculas pequeñas no comprenden exclusivamente enlaces peptídicos. Se describe además que las moléculas pequeñas no son oligoméricas. Los compuestos de moléculas pequeñas ilustrativos que pueden seleccionarse para actividad incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, Cane y otros 1998. Science 282: 63) y bibliotecas de extractos de productos naturales. También se describe que los compuestos son compuestos orgánicos no peptídicos pequeños. Se describe además que una molécula pequeña no es biosintética. Por ejemplo, una molécula pequeña preferentemente no es en sí misma el producto de la transcripción o traducción.

Ensayos de tamizaje

Los métodos descritos en la presente descripción son adecuados para su uso en métodos para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos potenciales, por ejemplo, identificar nuevos agentes farmacológicos de una colección de sustancias de prueba y/o caracterizar mecanismos de acción y/o efectos secundarios de agentes farmacológicos

conocidos. Se contemplan ensayos sin células así como también basados en células. En los ensayos basados en células descritos en la presente descripción, al menos un componente importante o crucial para la función de la célula de melanoma (por ejemplo, GDF6, señalización de BMP (incluido SMAD 1/5/8)) se analiza in vitro en presencia de un compuesto de prueba y se determina la capacidad del compuesto de prueba para unirse o modular la actividad del componente. Un efecto sobre el componente es un indicador del potencial farmacológico del compuesto. Puede analizarse la expresión de las moléculas de la vía BMP. Las moléculas de la vía BMP pueden analizarse para determinar la expresión y/o cualquier actividad bioquímica característica de dicho componente. Puede analizarse la expresión del factor de transcripción y el estado de fosforilación, tal como SMAD 1/5/8. Puede analizarse la actividad del factor de transcripción. Los ensayos basados en la transcripción (por ejemplo, que presentan una lectura del gen reportero) son ilustrativos. Los ensayos basados en células presentan preferentemente células que expresan GDF6, células que expresan al menos una proteína de la vía de señalización BMP y al menos un factor de transcripción que regula la transcripción de dicha proteína, o un complemento de dichos factores de transcripción y proteínas.

Las diversas formas del término "modular" incluyen la estimulación (por ejemplo, aumentar o regular positivamente una respuesta o actividad particular) y la inhibición (por ejemplo, disminuir o regular negativamente una respuesta o actividad particular).

Un "modulador de moléculas relacionadas con melanoma" incluye un modulador de la expresión, procesamiento, modificación postraduccional y/o actividad de estas moléculas. El término incluye agentes, por ejemplo, un compuesto o compuestos que modulan la transcripción de la molécula de GDF6, una molécula de SMAD 1/5/8 o un gen de la molécula de la vía de señalización BMP, procesamiento de ARNm de moléculas relacionadas con melanoma (por ejemplo, corte y empalme), traducción de una molécula de GDF6, una molécula de SMAD 1/5/8, o un ARNm de molécula de la vía de señalización BMP, una molécula de GDF6 de modificación postraduccional, una molécula de SMAD 1/5/8, o una proteína de la molécula de la vía de señalización BMP (por ejemplo, glicosilación, ubiquitinación) o actividad de la molécula de GDF6, una molécula de SMAD 1/5/8 o una proteína de molécula de la vía de señalización BMP, tal como ALK3. Un "modulador de moléculas relacionadas con melanoma" incluye compuestos que modulan directamente o indirectamente la actividad de las moléculas relacionadas con melanoma. Por ejemplo, un modulador indirecto de la actividad de las moléculas relacionadas con melanoma puede modular una molécula no GDF6, una molécula no SMAD 1/5/8 o una molécula no de vía de señalización BMP que está en una vía de transducción de señales que incluye una de estas moléculas. Los ejemplos de moduladores que modulan directamente la expresión, el procesamiento, la modificación postraduccional y/o la actividad de moléculas relacionadas con melanoma incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido o ARNi que se unen al ARNm o ADN genómico de moléculas relacionadas con melanoma, anticuerpos que se unen a las moléculas relacionadas con melanoma y modulan (es decir, inhiben) las moléculas relacionadas con melanoma, activando anticuerpos que se unen a moléculas relacionadas con melanoma y modulan (es decir, mejoran) la actividad de moléculas relacionadas con melanoma, los péptidos de moléculas relacionadas con melanoma que modulan (inhiben o mejoran) la interacción de moléculas relacionadas con melanoma con una molécula diana y vectores de expresión que codifican moléculas relacionadas con melanoma que permiten un aumento de la actividad de moléculas relacionadas con melanoma en una célula, formas negativas dominantes de moléculas relacionadas con melanoma, así como también compuestos químicos que actúan para modular específicamente la actividad de las moléculas relacionadas con melanoma.

Como se usa indistintamente en la presente descripción, las expresiones "actividad de la molécula relacionada con melanoma", "actividad biológica de la molécula relacionada con melanoma" o "actividad funcional de la molécula relacionada con melanoma", incluyen las actividades ejercidas por una proteína de la molécula relacionada con melanoma en una célula o tejido sensible a la molécula relacionada con melanoma, por ejemplo, una célula de melanoma, o en una molécula de ácido nucleico de molécula relacionada con melanoma o molécula diana de proteína, según se determinó in vivo o in vitro, de acuerdo con técnicas estándar. La actividad de la molécula relacionada con melanoma puede ser una actividad directa, tal como una asociación con una molécula diana de molécula relacionada con melanoma. Alternativamente, una actividad de la molécula relacionada con melanoma es una actividad indirecta, tal como un evento biológico corriente abajo mediado por la interacción de la proteína de molécula relacionada con melanoma con una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma. Las actividades biológicas de las moléculas relacionadas con melanoma se describen en la presente descripción e incluyen: por ejemplo, permitir la supervivencia celular del melanoma (GDF6) y la señalización de la vía BMP (SMAD1/3/8). Estos hallazgos proporcionan el uso de moléculas relacionadas con melanoma como dianas farmacológicas y como dianas para la modulación de estas actividades biológicas en las células y para la intervención terapéutica en enfermedades tal como melanoma.

Ensayos sin células

Se describe en la presente descripción un ensayo que es un ensayo libre de células en el que una molécula relacionada con melanoma (o una porción biológicamente activa de esta) se pone en contacto con un compuesto de prueba y se determina la capacidad del compuesto de prueba de unirse al polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o fragmento bioactivo del mismo). La unión del compuesto de prueba al polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o fragmento bioactivo del mismo) puede lograrse, por ejemplo, mediante el acoplamiento del compuesto de prueba o el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o fragmento bioactivo del mismo) con un radioisótopo o marcador enzimático de manera que la unión del compuesto de prueba al polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o fragmento bioactivo del mismo) puede determinarse detectando el compuesto o polipéptido marcado en un

complejo. Por ejemplo, los compuestos o polipéptidos de prueba pueden marcarse con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , ya sea directamente o indirectamente, y el radioisótopo detectarse por recuento directo de radioemisión o por recuento de centelleo. Alternativamente, los compuestos o polipéptidos de prueba pueden marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático detectarse por determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

La unión del compuesto de prueba al polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o fragmento bioactivo del mismo) también puede lograrse mediante el uso de una tecnología tal como el Análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA). Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 y Szabo y otros, (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705. Como se usa en la presente descripción, "BIA" es una tecnología para estudiar interacciones biospecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore™). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) pueden usarse como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

Se describe que el ensayo incluye poner en contacto el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o una porción biológicamente activa del mismo) con una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma (o un fragmento bioactivo del mismo) para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o fragmento bioactivo del mismo), en donde determinar la capacidad del compuesto de prueba de interactuar con el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o fragmento bioactivo del mismo) comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba de unirse preferentemente al polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o la porción bioactiva del mismo) en comparación con la molécula diana de la molécula relacionada con melanoma. Se describe además que el ensayo incluye poner en contacto el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o una porción biológicamente activa del mismo) con una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma (o un fragmento bioactivo del mismo) para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba de modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la unión entre el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma y la molécula diana de la molécula relacionada con melanoma (o un fragmento bioactivo del mismo).

También se describe que el ensayo es un ensayo sin células en el que un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o una porción bioactiva del mismo) se pone en contacto con un compuesto de prueba y se determina la capacidad del compuesto de prueba de modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad del polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o porción biológicamente activa del mismo).

Además se describe que el ensayo sin células implica poner en contacto un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o una porción biológicamente activa del mismo) con una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma que se une al polipéptido de la molécula relacionada con melanoma de formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba de modular preferentemente la actividad de una pareja de unión o molécula diana a la molécula relacionada con melanoma, en comparación con el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma (o una porción biológicamente activa del mismo).

Se describe además que en los métodos de ensayo descritos en la presente descripción, puede ser conveniente inmovilizar una molécula relacionada con melanoma o su pareja de unión/molécula diana para facilitar la separación de formas complejas a formas no complejas de una o ambas proteínas, así como también para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, o la interacción de un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede lograrse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga. Se describe que puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de la glutatión-S-transferasa/molécula relacionada con melanoma o las proteínas de fusión de la glutatión-S-transferasa/diana pueden adsorberse en perlas de glutatión-sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas de glutatión, que después se combinan con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y la proteína diana no adsorbida, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las perlas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, la matriz se inmoviliza en el caso de las perlas, el complejo se determina ya sea directamente o indirectamente, por ejemplo, como se describió anteriormente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz, y el nivel de unión o actividad de la molécula relacionada con melanoma puede determinarse mediante el uso de técnicas estándar.

Los ejemplos ilustrativos adicionales de proteínas de fusión de moléculas relacionadas con melanoma incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión del dominio de unión a quitina (CBD), proteínas de fusión etiquetadas con epítipo de hemaglutinina (HA), proteínas de fusión His (por ejemplo, proteínas etiquetadas con His₆), proteínas de fusión etiquetadas con FLAG, proteínas etiquetadas con AU1 y similares.

También pueden usarse otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices en los ensayos de tamizaje de la invención. Por ejemplo, puede inmovilizarse un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma o una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. El polipéptido o las moléculas diana de la molécula relacionada con melanoma biotinilada de la presente invención pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, el kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), y se inmovilizan en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos reactivos con el polipéptido o las moléculas diana de la molécula relacionada con melanoma pero que no interfieren con la unión del polipéptido de la molécula relacionada con melanoma a su molécula diana pueden derivatizarse a los pocillos de la placa, y el polipéptido de la molécula diana o relacionada con melanoma no unido queda atrapado en los pozos por conjugación de anticuerpos. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con glutatión S-transferasa- (GST-), incluyen la inmunodetección de complejos mediante el uso de anticuerpos reactivos con el polipéptido o la molécula diana de la molécula relacionada con melanoma, así como también ensayos ligados a enzimas que dependen de la detección de una actividad enzimática asociada con el polipéptido o la molécula diana de la molécula relacionada con melanoma.

Aún en otro aspecto de la descripción, se describe que los polipéptidos de la molécula relacionada con melanoma pueden usarse como "proteínas de cebo" en un ensayo de dos híbridos o ensayo de tres híbridos (ver, por ejemplo, la patente de estados Unidos núm. 5,283,317; Zervos y otros (1993) Cell 72:223-232; Madura y otros (1993) J. Biol. Chem 268:12046-12054; Bartel y otros (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi y otros (1993) Oncogene 8:1693-1696; y Brent WO94/10300), para identificar otras proteínas que se unen o interactúan con moléculas relacionadas con melanoma ("proteínas de unión a moléculas relacionadas con melanoma" o "moléculas diana de moléculas relacionadas con melanoma") y están involucradas en la actividad de la molécula relacionada con melanoma. Es probable que tales moléculas diana de molécula relacionada con melanoma también estén involucradas en la regulación de las actividades celulares moduladas por los polipéptidos de molécula relacionada con melanoma.

Al menos un sistema de dos híbridos ilustrativo se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten en dominios de unión y activación de ADN separables. En resumen, el ensayo utiliza dos constructos de ADN diferentes. En un constructo, el gen que codifica un polipéptido de molécula relacionada con melanoma se fusiona con un gen que codifica el dominio de unión al ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de ADN, de una biblioteca de secuencias de ADN que codifica una "presa" o "muestra" de proteína no identificada se fusiona con un gen que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas "cebo" y "presa" pueden interactuar, in vivo, formando un complejo dependiente de la molécula relacionada con melanoma, los dominios de unión al ADN y de activación del factor de transcripción se acercan mucho. Esta proximidad permite la transcripción de un gen reportero (por ejemplo, LacZ) que está operativamente unido a un sitio regulador transcripcional que responde al factor de transcripción. La expresión del gen reportero puede detectarse y las colonias celulares que contienen el factor de transcripción funcional pueden aislarse y usarse para obtener el gen clonado que codifica la proteína que interactúa con el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma.

Otro sistema ilustrativo de dos híbridos, denominado en la técnica el sistema CytoTrap™, se basa en la naturaleza modular de las moléculas de la cascada de transducción de señales Ras. En resumen, el ensayo presenta una proteína de fusión que comprende la proteína "cebo" y Son-of-Sevenless (SOS) y los ADNc para proteínas no identificadas (la "presa") en un vector que codifica proteínas diana miristiladas. La expresión de una combinación apropiada de cebo-presa da como resultado la translocación de SOS a la membrana celular donde activa Ras. La reconstitución citoplasmática de la vía de señalización de Ras permite la identificación de proteínas que interactúan con la proteína cebo de interés, por ejemplo, la proteína de la molécula relacionada con melanoma. También se conocen en la técnica dos sistemas híbridos de mamíferos adicionales y pueden utilizarse para identificar proteínas que interaccionan con moléculas relacionadas con melanoma.

Ensayos basados en células

Además se describe un ensayo que es un ensayo basado en células en el que una célula que expresa un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, o una porción biológicamente activa del mismo, se pone en contacto con un compuesto de prueba y se determina la capacidad del compuesto de prueba de modular la actividad del polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, o parte biológicamente activa del mismo. La célula, por ejemplo, puede ser de origen mamífero. El polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, por ejemplo, puede expresarse de forma heteróloga o nativa con respecto a la célula. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba de modular la actividad de un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, o una porción biológicamente activa del mismo, puede lograrse mediante el ensayo de cualquiera de las actividades de un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma descrito en la presente descripción.

La determinación de la capacidad de un compuesto de prueba de modular la actividad de un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, o una porción biológicamente activa del mismo, también puede lograrse mediante el ensayo de la actividad de una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma. Se describe que la célula que expresa el polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, o una porción biológicamente activa del mismo, expresa además una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma, o una porción biológicamente activa del mismo.

Además se describe que un ensayo es un ensayo basado en células en el que una célula que expresa un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, o una porción biológicamente activa del mismo, se pone en contacto con un péptido bioactivo derivado de una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma y un compuesto de prueba y se determina la capacidad del compuesto de prueba de modular la actividad del polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, o una porción biológicamente activa del mismo.

De acuerdo con los ensayos basados en células descritos en la presente descripción, la determinación de la capacidad del compuesto de prueba de modular la actividad del polipéptido de la molécula relacionada con melanoma o una porción biológicamente activa del mismo, puede determinarse analizando cualquiera de las actividades nativas de un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma descrito en la presente descripción, por ejemplo, analizando el estado de fosforilación de SMAD 1/5/8, o la apoptosis. Además se describe que un ensayo es un ensayo basado en células que comprende poner en contacto una célula que expresa una molécula relacionada con melanoma y se controla la expresión de la molécula relacionada con melanoma. Además, la actividad del polipéptido de la molécula relacionada con melanoma o la porción biológicamente activa del mismo, puede determinarse analizando una actividad indirecta que es coincidente con la actividad de un polipéptido de la molécula relacionada con melanoma. Además, la determinación de la capacidad del compuesto de prueba de modular la actividad del polipéptido de la molécula relacionada con melanoma o una porción biológicamente activa del mismo, puede determinarse analizando una actividad que no sea nativa con respecto al polipéptido de la molécula relacionada con melanoma, pero para la cual la célula se ha modificado genéticamente de forma recombinante. Por ejemplo, la célula puede modificarse para que exprese una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma que es una proteína recombinante que comprende una porción bioactiva de una molécula diana de la molécula relacionada con melanoma unida operativamente a un polipéptido de la molécula diana de la molécula no relacionada con melanoma. También se describe que los ensayos basados en células descritos en la presente descripción comprenden una etapa final de identificación del compuesto como un modulador de la actividad de la molécula relacionada con melanoma.

Compuestos de prueba

Los compuestos de prueba de la presente descripción pueden obtenerse mediante el uso de cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase sólida o en fase en solución paralela espacialmente direccionable; métodos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; el método de biblioteca "una perla un compuesto"; y métodos de biblioteca sintética que usan 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 se aplican a bibliotecas de compuestos de oligómeros peptídicos y no peptídicos o de moléculas pequeñas (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo en: DeWitt y otros, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb y otros, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann y otros, (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho y otros, (1993) *Science* 261:1303; Carell y otros, (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell y otros, (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y en Gallop y otros, (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 (patente de los Estados Unidos núm. 5,223,409 de Ladner), esporas (patente de los Estados Unidos núm. 409 de Ladner), plásmidos (Cull y otros, (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 y otros, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner más arriba).

Se describe que la biblioteca puede ser una biblioteca de productos naturales, por ejemplo, una biblioteca producida por un cultivo bacteriano, fúngico o de levadura. En otra modalidad, la biblioteca es una biblioteca de compuestos sintéticos.

Composiciones farmacéuticas

La invención se refiere a los usos de los agentes descritos anteriormente para tratamientos terapéuticos como se describe más abajo. En consecuencia, se describe que los moduladores de la presente invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Tales composiciones comprenden típicamente la molécula de ácido nucleico, proteína, anticuerpo o compuesto modulador y un portador farmacéuticamente aceptable. Un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónico y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Compuestos activos suplementarios pueden incorporarse también en las composiciones.

Una composición farmacéutica descrita en la presente descripción se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo,

intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), y transmucosa. Las soluciones o suspensiones que se usan para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir dispersiones o soluciones acuosas estériles (solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamonada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos tales como bacteria y hongos. El portador puede ser un medio de dispersión o solvente que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por medio del uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por medio del uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse con varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato aluminico y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización con filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de éste.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales pueden prepararse además mediante el uso de un portador fluido para su uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral y se agita y expectora o traga. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tales como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tales como almidón o lactosa, un agente desintegrante tales como ácido alginico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tales como estearato de magnesio o esterotes; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tales como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tales como yerbabuena, salicilato de metilo, o sabor de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en la forma de una atomización de aerosol desde un contenedor o dispersador presurizado que contiene un propulsor adecuado por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica puede ser además por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan penetrantes adecuados en la formulación para la barrera que se penetra. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal puede lograrse a través del uso de atomizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas que se conocen generalmente en la técnica.

Los compuestos pueden prepararse además en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

Se describe que los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tal como acetato de etilvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales pueden obtenerse, además,

comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) pueden usarse, además, como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 4,522,811.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria como se usa en la presente descripción se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitarias de la invención se dictan por, y dependen directamente de, las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición tal como un compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacológicos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que muestran índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado, para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos en cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos está, preferentemente, dentro del intervalo de las concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de ese intervalo en dependencia de la forma de dosificación que se emplea, y de la vía de administración que se utiliza. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos en cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la EC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la mitad de la respuesta máxima) como se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar las dosis útiles en humanos con mayor precisión. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

Uso de GDF6 o señalización de BMP como marcadores de diagnóstico de melanoma

Dado que los inventores han descubierto que GDF6 y la señalización de BMP se correlaciona con el inicio y mantenimiento del melanoma, se describe que estas moléculas pueden usarse como marcadores de diagnóstico de melanoma. En resumen, las muestras de un sujeto se recolectan y analizan para determinar la expresión de GDF6 o moléculas de señalización de BMP (tal como SMAD 1/5/8 fosforilada). La detección de estas moléculas en un tejido en comparación con un control adecuado (tal como el tejido sano afin) indica la presencia o inicio de un melanoma o cáncer.

Preparación de muestras

Las células o muestras de tejidos se recolectan a partir de un sujeto. El sujeto es un vertebrado, con mayor preferencia un mamífero, tal como un mono, perro, gato, conejo, vaca, cerdo, cabra, oveja, caballo, rata, ratón, conejillo de indias, etc.; y con la máxima preferencia un humano. Puede emplearse cualquier técnica para recolectar la muestra deseada, incluyendo biopsia o cirugía.

Detección de moléculas de señalización de GDF6 y BMP: Métodos basados en anticuerpos

Los métodos inmunoquímicos para detectar la expresión de proteínas, tal como las proteínas de señalización de GDF6 o BMP, se conocen bien e incluyen transferencia de tipo Western, purificación por inmutafinidad, inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia puntual o por ranuras, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente, inmunoensayo quimoluminiscente (CMIA), detección inmunohistoquímica, tinción inmunocitoquímica y citometría de flujo.

Los anticuerpos seleccionados que son útiles para detectar GDF6 están disponibles de Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA; productos núms. PA5-14394, PA5-20568), Biorbyt (San Francisco, CA; núms. del producto orb29645, orb75023, orb38022, orb157096), antibodies-online.com (Atlanta, GA; núms. del producto ABIN391699, ABIN655618, ABIN223491, ABIN342682, ABIN499881, ABIN950666, ABIN1411548, ABIN1757462, ABIN1858990, ABIN1805120, ABIN1411547, ABIN961880, ABIN1841949, ABIN1393653, ABIN1411550, ABIN1393657, ABIN1387414, ABIN1757463, ABIN1393654, ABIN1393655, ABIN1858989, ABIN1411545, ABIN1393656, ABIN1393658, ABIN1492198, ABIN1411546, ABIN1001913, ABIN1587025, ABIN541367), Lifespan Biosciences (Seattle, WA; núms. del producto LS-C83887, LS-C100696, LS-C146966, LS-C302848, LS-C166429, LS-C300549, LS-C294355, LS-C294354), Aviva Systems Biology

(San Diego, CA; núms. del producto OAPB00713, OAAB07917, OAAB04538), R&D Systems (Minneapolis, MN; núm. del producto AF855), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX; núm. del producto sc-6902), Atlas Antibodies (Stockholm, Sweden; núm. del producto HPA045206), St. John's Laboratory (Atlanta, GA; núms. del producto STJ50764, STJ41772), Cloud-Clone Corp. (Houston, TX; núm. del producto PAC111Mu01), Acris Antibodies (Atlanta, GA; núms. del producto AP51812PUN, AP30360PU-N), Abgent (Atlanta, GA; núms. del producto AP11672a, AP7483b), Origene (Rockville, MD; núm. del producto TA306608), Abbiotec (Atlanta, GA; núm. del producto 253907), United States Biological (Salem, MA; núms. del producto G8989-46, 35985, 140562), Abbexa (Atlanta, GA; núms. del producto abx33429, abx26376), Abcam (Cambridge, MA; núms. del producto ab135661, ab73288, ab170532), ProSci (Loveland, CO; núm. del producto 4691), Abnova (Atlanta, GA; núm. del producto PAB13050), GeneTex (Irvine, CA; núm. del producto GTX81418), y Novus Biologicals (Littleton, CO; núms. del producto NBP1-91934, NBP1-76364, NBP1-45406).

Más de 500 anticuerpos para detectar SMAD1/5/8 están disponibles comercialmente; algunos pueden distinguir entre SMAD1/5/8 fosforilado y no fosforilado. Algunos de estos están disponibles en Rockland (Limerick, PA; núms. del producto 600-401-B23S, 600-401-B29S, 600-401-B23), Lifespan Biosciences (Seattle, WA; núms. del producto LS-B9239, LS-B10841, LS-C117925, LS-C80224, LS-C39125, LS-C138352, LS-C89093, LS-C132135, LS-C132134, LS-C89094, LS-C132133, LS-C31108, LS-C47059, LS-C39124, LS-C47102, LS-C79984, LS-C49618, LS-C89095, LS-C17859, LS-C48441, LS-C117539, LS-C137103, LS-C200706, LS-C177750, LS-C297547, LS-C240995, LS-C295417, LS-C295415, LS-C313543, LS-C240994, LS-C182556, LS-C240993, LS-C150071, LS-C191736, LS-C205361, LS-C191292, LS-C205161, LS-C133301, LS-C313542, LS-C241001, LS-C199577, LS-C150314, LS-C240996, LS-C176672, LS-C184123, LS-C172147, LS-C133300, LS-C248202, LS-C133299, LS-C305603, LS-C205282, LS-C184471, LS-C199578, LS-C133298, LS-C75853, LS-C190250, LS-C172149, LS-C172148, LS-C154246, LS-C156106, LS-C192196, LS-C152338, LS-C154249, LS-C295416, LS-C335924, LS-C331155, LS-C203001, LS-C335947, LS-C331261, LS-C325187, LS-C313635, PA1-41141, PA1-41238, PA1-41079, PA5-17122), Life Technologies (Grand Island, NY; núms. del producto 385400, 700047, 701168, 710199), Biorbyt (núms. del producto orb137917, orb126689, orb14693, orb128756, orb127512, orb106504, orb128757, orb14985, orb106255, orb137645, orb27546, orb159690, orb166630, orb129744, orb76556, orb106505, orb106256, orb76562, orb77385, orb11383, orb16322, orb158427, orb193076, orb154203, orb162780, orb162781, orb158426, orb192073, orb193031, orb191858, orb48619, orb193811), antibodies-online.com (núms. del producto ABIN183694, ABIN482828, ABIN393545, ABIN393492ABIN309906, ABIN393407, ABIN482239, ABIN481808, ABIN1532647, ABIN258473, ABIN1531627, ABIN1531198, ABIN1532214, ABIN483263, ABIN964908, ABIN223178, ABIN127139, ABIN964911, ABIN309632, ABIN319351, ABIN324489, ABIN202590, ABIN401471, ABIN272123, ABIN401472, ABIN401465, ABIN319257, ABIN401466, ABIN189594, ABIN933125, ABIN927059, ABIN349628, ABIN349630, ABIN274227, ABIN273707, ABIN273706, ABIN274226, ABIN1881815, ABIN598792, ABIN732164, ABIN517613, ABIN517612, ABIN207527, ABIN517616, ABIN325894, ABIN732162, ABIN605427, ABIN598791, ABIN732165, ABIN732161, ABIN561713, ABIN517610, ABIN561711, ABIN732167, ABIN791052, ABIN650448, ABIN517609, ABIN598790, ABIN732158, ABIN517615, ABIN598793, ABIN517614, ABIN781341, ABIN732163, ABIN363042, ABIN517611, ABIN732160, ABIN215474, ABIN352292, ABIN207569, ABIN241890, ABIN874784, ABIN915706, ABIN746022, ABIN915709, ABIN874781, ABIN498431, ABIN746020, ABIN746018, ABIN915710, ABIN204726, ABIN746027, ABIN746025, ABIN362414, ABIN874783, ABIN746021, ABIN746023, ABIN874782, ABIN746024, ABIN915707, ABIN1836313, ABIN1874849, ABIN1870609, ABIN958266, ABIN1874850, ABIN1835197, ABIN1821900, ABIN950121, ABIN1513536, ABIN1816440, ABIN1838551, ABIN204727, ABIN1860587, ABIN1831955, ABIN352291, ABIN1823822, ABIN1104364, ABIN1823368, ABIN1831609, ABIN1804509, ABIN1874848, ABIN967044, ABIN1104365, ABIN1815373, ABIN959573, ABIN1860586, ABIN534398, ABIN437988, ABIN643268, ABIN802764, ABIN1765877, ABIN1848036, ABIN446925, ABIN1579581, ABIN1682045, ABIN408128, ABIN1765875, ABIN1845442, ABIN1765874, ABIN1579582, ABIN1847220, ABIN1579580, ABIN1847368, ABIN641219, ABIN1856906, ABIN556465, ABIN1682803, ABIN1092467, ABIN184544, ABIN1579579, ABIN546471, ABIN548306, ABIN448968, ABIN967042, ABIN967043), Boster Immunoleader (Atlanta, GA; núms. del producto PA2114, PA1331), Aviva Systems Biology (San Diego, CA; núms. del producto OAAF00650, OAAF01080, OAAF00206, OAAF00021, OAEC02036, OAEC02038, OAEC02039, OAEC01471, OAEC01470, OAEC00286, OAEC00646, OAAB15530, OAAF02467, OARA03110, OARA03111, OARA03112, OARA03109, ARP32003_P050, OABB00290, ARP38692_T100, ARP38693_T10), NovaTeinBio (Woburn, MA; núm. del producto 67445), y Biosensis (Temecula, CA; núm. del producto R-1368-100).

Si se desean anticuerpos adicionales, pueden producirse mediante el uso de métodos bien conocidos, algunos de los cuales se describen más abajo.

Un enfoque mediante el uso de anticuerpos para detectar la presencia de un antígeno en general incluye uno o más de las siguientes etapas:

- (1) unir la muestra que se prueba para un antígeno, tal como GDF6 o SMAD1/5/8, a un sustrato apropiado;
- (2) lavar la muestra con tampón o agua;
- (3) bloquear los sitios de unión no-específicos del anticuerpo;
- (4) aplicar el anticuerpo; y
- (5) detectar el anticuerpo unido, ya sea *a través de* un anticuerpo secundario con marcaje detectable que reconoce el anticuerpo primario o un marcador detectable que se ha unido directamente a, o asociado con, el anticuerpo unido (anti-GDF6 o anti-SMAD1/5/8).

Los sustratos pueden lavarse con cualquier solución que no interfiera con la estructura del epítipo. Los tampones comunes incluyen solución salina y tampones biológicos, tales como bicina, tricina, y Tris.

Los sitios de unión no-específicos se bloquean aplicando una solución de proteína, tal como albúmina sérica bovina (BSA; desnaturalizada o nativa), proteínas de la leche, o en los casos en donde el reactivo de detección es un anticuerpo secundario, suero normal o inmunoglobulinas de un animal huésped no-inmunizado cuya especie es del mismo origen que el anticuerpo de detección. Por ejemplo, un procedimiento mediante el uso un anticuerpo secundario fabricado en cabras puede emplear el suero normal de cabra (NGS).

El sustrato se hace reaccionar después con el anticuerpo de interés. El anticuerpo puede aplicarse en cualquier forma, tal como fragmentos F_{ab} y derivados de los mismos, anticuerpo purificado (por afinidad, precipitación, *etc.*), sobrenadante de cultivos de hibridoma, ascitis, suero o anticuerpos recombinantes expresados en células recombinantes. El anticuerpo se puede diluir en tampón o medios, frecuentemente con una proteína portadora tal como la solución usada para bloquear los sitios de unión no-específica; la concentración de anticuerpo útil se determina generalmente de forma empírica. Generalmente, sueros policlonales, anticuerpos y ascitis purificadas se pueden diluir 1:50 a 1:200,000, más frecuentemente, 1:200 a 1:500. Los sobrenadantes de hibridoma pueden diluirse 1:0 a 1:10, o se pueden concentrar por diálisis o precipitación con sulfato de amonio (o cualquier otro método que retiene los anticuerpos de interés pero al menos elimina parcialmente el componente líquido y preferentemente otras moléculas pequeñas, tales como sales) y diluir si es necesario. La incubación con los anticuerpos puede llevarse a cabo por tan poco como 20 minutos a 37 °C, de 1 a 6 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C), u 8 o más horas a 4 °C.

Para detectar un complejo de antígeno-anticuerpo, puede usarse el marcador. El marcador puede acoplarse al anticuerpo de unión o a un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo y se incuba con la muestra después de la incubación del anticuerpo primario y a través del lavado. Los marcadores adecuados incluyen porciones fluorescentes, tales como isotiocianato de fluoresceína; diclorotriazina de fluoresceína y análogos fluorados de fluoresceína; ácido carboxílico de naftofluoresceína y su éster succinimidilo; carboxi-rodamina 6G; derivados del piridiloxazol; Cy2, 3 y 5; ficoeritrina; especies fluorescentes de ésteres de succinimidilo, ácidos carboxílicos, isotiocianatos, cloruros de sulfonilo, y cloruros de dansilo, incluyendo ésteres de succinimidilo del ácido propiónico, y ésteres de succinimidilo del ácido pentoico; ésteres de succinimidilo de carboxitetrametilrodamina; éster de succinimidilo de rodamina roja X; cloruro de sulfonilo de Rojo Texas; éster succinimidilo de Rojo Texas-X; éster de tetrafluorofenol sódico de Rojo Texas-X; Rojo-X; colorantes Rojo Texas; tetrametilrodamina; lisamina rodamina B; tetrametilrodamina; isotiocianato de tetrametilrodamina; naftofluoresceínas; derivados de la cumarina; pirenos; derivados del piridiloxazol; colorantes dapoxyl; colorantes de cascada azul y amarillo; isotiocianatos benzofurano; tetrafluorofenoles sódicos; 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno. Los marcadores adecuados incluyen además porciones enzimáticas, tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante; porciones radiactivas, incluyendo marcadores ^{35}S y ^{125}I ; sistemas de detección basados en biotina-avidina (o estreptavidina) (frecuentemente acoplado con sistemas de señal enzimática u oro); y partículas de oro. En el caso de los sistemas de detección basados en enzimáticos, la enzima se hace reaccionar con un sustrato apropiado, tal como 3, 3'-diaminobencidina (DAB) para peroxidasa de rábano picante; preferentemente, los productos de reacción son insolubles. Las muestras marcadas con oro, si no se preparan para análisis ultraestructurales, se pueden hacer reaccionar químicamente para mejorar la señal del oro; este enfoque es especialmente deseable para microscopía de luz. La elección del marcador depende de la aplicación, la resolución deseada y los métodos de observación deseados. Para los marcadores fluorescentes, el fluoróforo se excita con la longitud de onda adecuada y la muestra se observa mediante el uso un microscopio, el microscopio confocal, o dispositivo FACS. En el caso del marcado radiactivo, las muestras se ponen en contacto con la película de autorradiografía, y la película se revela; alternativamente, la autorradiografía también puede realizarse con enfoques ultraestructurales. Alternativamente, la radioactividad se puede cuantificar mediante el uso un contador de centelleo.

Enfoques morfológicos acoplados:

La presencia de GDF6 o SMAD 1/5/8 puede determinarse mediante inmunolocalización. Generalmente, las células o tejido se conservan mediante fijación, se exponen a un anticuerpo que reconoce el epítipo de interés, tal como GDF6 o SMAD 1/5/8, y se detecta el anticuerpo unido.

Cualquier tejido o incluso un organismo completo es apropiado para la fijación. El tejido puede ser de cualquier órgano (tal como piel), y puede cosecharse después o antes de la fijación.

La fijación, si se desea, puede ser mediante cualquier medio conocido; los requisitos son que la proteína a detectar no permanezca irreconocible por el agente de unión, con más frecuencia un anticuerpo. Los fijadores apropiados incluyen paraformaldehído-lisina-peryodato, formalina, paraformaldehído, metanol, ácido acético-metanol, glutaraldehído, acetona, fijador de Karnovsky, *etc.* La selección del fijador depende de variables tales como la proteína de interés, las propiedades de un reactivo de detección particular (tal como un anticuerpo), el método de detección (fluorescencia, enzimático) y el método de observación (microscopía de epifluorescencia, microscopía confocal, microscopía de luz, microscopía electrónica *etc.*). La muestra se lava primero por lo general, más frecuentemente con un tampón biológico, antes de la fijación. Los agentes de fijación se preparan en solución o en tampones biológicos; muchos fijadores se preparan inmediatamente antes de aplicar a la muestra. Los tampones biológicos adecuados incluyen solución salina (*por ejemplo*, solución salina tamponada con fosfato), ácido N-(carbamoilmetil)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido N-2-acetoamido-2-iminodiacético (ADA), bicina, bis-tris, ácido 3-ciclohexilamino-2-hidroxi-1-propanosulfónico (CAPSO), etanolaminas, glicina, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico (MES), ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico (MOPS), ácido 3-N-morfolino-2-hidroxi-propanosulfónico (MOPSO), piperazina-N,N'

- bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), tricina, trietanolamina, *etc.* Un tampón adecuado se selecciona de acuerdo con la muestra que se analiza, pH adecuado, y los requisitos del método de detección. Un tampón útil es la solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de la fijación, la muestra puede almacenarse en fijador, preferentemente fresco, o de forma temporal o indefinida, a una temperatura entre aproximadamente 4 °C a aproximadamente 22 °C. En algunos casos, en dependencia de las características de la muestra, la muestra puede unirse a un sustrato, tal como un cubreobjetos de vidrio, portaobjetos de microscopio o plástico. Tales sustratos pueden tratarse para mejorar la unión; tales tratamientos incluyen cargar el sustrato, recubrir el sustrato con un material adhesivo, tal como poli-(L o D o combinación)-lisina, moléculas o composiciones de matriz extracelular, *etc.*
- Después de la fijación de 5 minutos a 1 semana, en dependencia del tamaño de la muestra, grosor de la muestra, y viscosidad del fijador, la muestra se lava en el tampón. Si la muestra es gruesa o se desean secciones, la muestra se puede embeber en una matriz adecuada. Para el crioseccionamiento, la sacarosa se infunde, y embebe en una matriz, tal como OCT Tissue Tek (Andwin Scientific; Canoga Park, California) o gelatina. Las muestras pueden embeberse además en cera de parafina, o resinas adecuadas para microscopía electrónica, tal como basadas en epóxido (Araldite, Polybed 812, Durcupan ACM, Quetol, Spurr's o mezclas de estos; Polysciences, Warrington, PA), acrilatos (London Resins (LR blanco, LR oro), Lowicryls; Unicryl; Polysciences), metilacrilatos (JB-4, OsteoBed; Polysciences), melamina (Nanoplast; Polysciences) y otros medios tales como DGD, Immuno-Bed (Polysciences) y después se polimerizan. Las resinas que son especialmente apropiadas incluyen resinas hidrófilas (tales como Lowicryls, London Resins, Durcupan soluble en agua, *etc.*) ya que son menos propensas a desnaturar la proteína de interés durante la polimerización y no repelerán las soluciones de anticuerpos. Cuando se incrustan en cera o resina, las muestras se deshidratan pasando a través de ellos una serie de concentraciones de etanol o metanol; en algunos casos, otros disolventes pueden usarse, tal como, óxido de polipropileno. La incrustación puede ocurrir después que la muestra se ha hecho reaccionar con los agentes de detección, o las muestras se pueden primero incrustar, seccionar (a través de micrótopo, cirótomo o ultramicrótopo) y después las secciones reaccionar con los reactivos de detección. En algunos casos, los materiales de incrustación pueden eliminarse parcialmente o totalmente antes de la detección para facilitar el acceso de los antígenos.
- En algunos casos, el(los) epítipo(s) de GDF6 or SMAD 1/5/8 al(a los) que se une el anticuerpo puede(n) volverse no disponible(s) debido a la fijación. Los métodos de recuperación del antígeno pueden usarse para hacer disponible el antígeno para la unión del anticuerpo. Muchos recursos están disponibles. Los métodos comunes incluyen usar el calor suministrado de autoclaves, microondas, agua o tampones calientes, ollas a presión, u otras fuentes de calor. Frecuentemente las fuentes de calor se usan en secuencia; las muestras deben estar frecuentemente en solución (*por ejemplo*, tratamientos de microondas). El detergente puede desenmascarar además los antígenos, tales como dodecil sulfato sódico (SDS, 0,25 % al 1 %) u otro tipo de detergentes de desnaturación. Los métodos químicos incluyen álcalis fuertes (tales como NaOH), inmersión prolongada en agua, urea, ácido fórmico y refijación en sulfato de zinc-formalina.
- En otros casos, el tratamiento con enzima proteolítica modificará el antígeno de manera que esté disponible para el anticuerpo. Cualquier número de proteasas pueden usarse, tal como tripsina. Estos métodos se pueden combinar para lograr resultados óptimos. La selección del método de recuperación del antígeno dependerá de la muestra, su incrustación (si la hay), y el anticuerpo anti-GDF6 o anti-SMAD 1/5/8.
- Especialmente en los casos de detección basada en el producto enzimático o inmunofluorescente, puede apagarse la señal de fondo debido al fijador residual, entrecruzamiento de proteínas, precipitación de proteínas o enzimas endógenas, mediante el uso de, *por ejemplo*, cloruro de amonio o borohidruro de sodio o una sustancia, para desactivar o agotar las enzimas endógenas que desorientan, tal como el peróxido de hidrógeno, que actúa sobre las peroxidadas. Para detectar las proteínas intracelulares en las muestras que no se deben seccionar, las muestras se pueden permeabilizar. Los agentes de permeabilización incluyen detergentes, tales como t-octilfenoxipolietoxietanoles, polioxietilensorbitanos, y otros agentes, tales como lisinas, proteasas, *etc.*
- Los sitios de unión no específicos se bloquean por la aplicación de una solución de proteína, tal como albúmina de suero bovino (BSA; desnaturada o nativa), proteínas de la leche, o preferentemente en los casos en donde el reactivo que detecta es un anticuerpo, suero normal o IgG de un animal huésped no-inmunizado cuya especie es del mismo origen del anticuerpo de detección.
- Enfoques basados en ensayos bioquímicos:
- En algunos aspectos, puede ser conveniente extraer GDF6 o SMAD 1/5/8 antes de la detección. Esto puede lograrse de varias maneras, tal como la extracción celular simple, la extracción diferencial o la interrupción mecánica. Los reactivos de extracción son bien conocidos. Por ejemplo, los solventes tal como metanol pueden ser útiles ocasionalmente. Más probablemente, los detergentes, tales como t-octilfenoxipolietoxietanol (además conocidos como polietilenglicol terc-octilfenil éter) son particularmente útiles para las extracciones simples. Son útiles además los glucopiranosidos, maltopiranosidos, maltósidos, ésteres de polioxietileno, otros éteres de polioxietileno, sales de los ácidos algínico, caprílico, cólico 1-decanosulfónico, desoxicólico, dioctilo sulfosuccinato, 1-dodecanosulfónico, gliocólico, glicodesoxicólico, 1-heptanosulfónico, 1-hexanosulfónico, N-lauroilsacrosina, sulfato de laurilo (*por ejemplo*, SDS), 1-nonanosulfónico, 1-octanosulfónico, 1-pentanosulfónico, taurocólico y tauodexicólico; 7-etil-2-metilo-4-undecil sulfato de sodio, y 2-etilhexil sulfato de sodio. Otros detergentes útiles incluyen (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato, (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano-sulfonato, N-decil-, N-dodecil-, N-hexadecil-, N-octadecil-, N-tetradecil-N,N-dimetilo-3-amonio-1-propanosulfonatos y fosfatidilcolina. Menos útiles, pero pueden ser útiles

en algunos casos, son bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bromuro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, cetilpiridinio, bromuro de decametonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio, cloruro de metilbencetonio, cloruro de metiltiroctilamonio, y N,N',N'-polioxietileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano. Los diferentes reactivos de extracción pueden usarse solos o en combinación; ellos pueden prepararse en soluciones acuosas simples o tampones adecuados.

El polietilenglicol terc-octilfenil éter es particularmente útil para la extracción diferencial aprovechando el punto de enturbiamiento bajo para separar las proteínas de membrana de las proteínas solubles en dos fases diferentes. Los tampones de extracción pueden contener inhibidores de proteasa, tal como aprotinina, benzamidina, antipaina, pepstatina y yodoacetamida.

Los extractos después se analizan para GDF6 o SMAD1/5/8. Preferentemente, GDF6 o SMAD1/5/8 se detecta mediante el uso de una técnica de ensayo inmunoquímico. Se conocen diversos tipos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para detectar las proteínas, y estos son aplicables a la detección de GDF6 y SMAD1/5/8. Sin embargo, también pueden usarse ensayos tipo ELISA que emplean técnicas de marcado alternativas. Estos incluyen Radioinmunoensayo (RIA), Inmunoensayo fluorescente (FIA), Inmunoensayo quimioluminiscente (CMIA) y otros ensayos y procedimientos de unión de anticuerpos no ligados a enzimas. Pueden usarse varios formatos de ensayo que incluyen ensayos competitivos (reactivos limitados) e inmunométricos. Además, pueden usarse ensayos heterogéneos y ensayos homogéneos incluidos el ensayo de aglutinación, la nefelometría y la turbidimetría, la técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT®) y la polarización de fluorescencia.

La técnica ELISA sándwich de doble anticuerpo es especialmente útil. El protocolo básico para un ELISA sándwich de doble anticuerpo es el siguiente: Una placa se recubre con anticuerpos anti-GDF6 o anti-SMAD1/5/8 (anticuerpos de captura). La placa se lava después con un agente bloqueador, tal como BSA, para bloquear la unión no específica de proteínas (anticuerpos o antígenos) a la placa de prueba. La muestra de prueba se incuba después sobre la placa recubierta con los anticuerpos de captura. La placa después se lava, se incuba con anticuerpos anti-GDF6 o anti-SMAD1/5/8, se lava de nuevo, y se incuba con un conjugado marcado con el anticuerpo específico y se detecta adecuadamente la señal.

En otros ELISA, las proteínas o péptidos se inmovilizan sobre una superficie seleccionada, la superficie puede tener, o tratarse para que tenga una afinidad para la unión a polipéptidos, tales como los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno especialmente tratada. Después de lavar para eliminar el material adsorbido incompletamente, uno podría después generalmente desear unir o recubrir con una proteína no específica que se sabe que es antigénicamente neutra con los anticuerpos anti-GDF6 o anti-SMAD 1/5/8, tales como BSA o caseína, en la parte inferior del pocillo. Esta etapa permite bloquear los sitios de adsorción no específicos sobre la superficie de inmovilización y reduce así, el fondo causado por la unión no específica de anticuerpos sobre la superficie. Cuando se crean los anticuerpos en un animal conjugando un polipéptido a una proteína (*por ejemplo*, BSA), una proteína diferente se usa por lo general como un agente de bloqueo, debido a la posibilidad de la presencia de anticuerpos para la proteína de bloqueo en la composición de anticuerpo.

Después de unir GDF6 o SMAD 1/5/8 al pocillo, recubrir con un material no-reactivo para reducir el fondo, y lavar para eliminar el material no unido, la superficie de inmovilización se pone en contacto con una composición de anticuerpo anti-GDF6 o anti-SMAD1/5/8 de manera propicia para la formación del complejo inmunitario (antígeno/anticuerpo). Tales condiciones incluyen diluir la composición de anticuerpo con diluyentes tales como BSA, y globulina bovina (BGG) y PBS/monolaurato de polioxietilensorbitán. Estos agentes añadidos además ayudan en la reducción de la señal de fondo no específica. La composición de anticuerpos en capas se deja después incubar durante *por ejemplo*, de aproximadamente dos a cuatro horas a 25 °C a 37 °C. Después de la incubación, la superficie en contacto con la composición de anticuerpo se lava para eliminar el material no inmunocomplejado. Un procedimiento de lavado incluye lavar con PBS/monolaurato de polioxietilensorbitán o solución tampón de borato.

Después de la formación de inmunocomplejos específicos entre la muestra de prueba y el anticuerpo y el posterior lavado, se detecta la formación de inmunocomplejo mediante el uso de un segundo anticuerpo que tiene especificidad para el anticuerpo anti-GDF6 o anti-SMAD 1/5/8. Para la detección, el anticuerpo secundario se asocia con la etiqueta detectable, tal como una enzima o una molécula fluorescente.

Transferencia de Western

Los métodos de transferencia de Western son bien conocidos. Generalmente, una muestra de proteína se somete a electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) a condiciones tales como para producir una separación adecuada de proteínas dentro de la muestra. Las proteínas se transfieren después a una membrana (*por ejemplo*, nitrocelulosa, nilón, etc.) de tal manera que se mantengan las posiciones relativas de las proteínas entre sí.

Las proteínas visiblemente marcadas de peso molecular conocido pueden incluirse dentro de un carril del gel. Estas proteínas sirven como un control para asegurar la transferencia adecuada de las proteínas a la membrana, así como marcadores de peso molecular para determinar el peso molecular relativo de otras proteínas en la mancha. Alternativamente, las proteínas marcadoras no marcadas se detectan después de la transferencia con Azul Brillante (G o

R; Sigma; St. Louis, MO) u otros colorantes de proteínas. Después de la transferencia de proteína, la membrana se sumerge en una solución bloqueadora para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario.

El anticuerpo primario, por ejemplo, anti-GDF6 o anti-SMAD1/5/8 puede marcarse y la presencia y peso molecular del antígeno puede determinarse mediante la detección de la marca en un lugar específico en la membrana. Sin embargo, el anticuerpo primario puede no estar marcado, y la mancha se hace reaccionar además con un segundo anticuerpo marcado. Este anticuerpo secundario es inmunoreactivo con el anticuerpo primario; por ejemplo, el anticuerpo secundario puede ser uno para inmunoglobulinas de conejo y marcado con fosfatasa alcalina.

Ensayos de pronósticos

También se describe que los métodos de diagnóstico pueden usarse además para identificar sujetos que tienen, o están en riesgo de desarrollar, una neoplasia en una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad. Los ensayos de pronóstico pueden usarse para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una neoplasia, tal como un sujeto que tiene un antecedente familiar de neoplasias dañinas, especialmente cánceres, tal como melanoma. Un método para identificar un individuo tal incluiría una muestra de prueba obtenida de un sujeto.

Kits

Se describe además que los kits, contenedores, paquetes, o dispensadores que contienen sondas de GDF6 y/o SMAD 1/5/8 y reactivos de detección, junto con las instrucciones para la administración, pueden ensamblarse. Cuando se suministra como un kit, los diferentes componentes se pueden envasar en envases separados y se mezcla inmediatamente antes del uso. Tal envasado de los componentes por separado puede permitir el almacenamiento a largo plazo sin perder las funciones de los componentes activos.

Los kits pueden incluir además los reactivos en contenedores separados que facilitan la ejecución de una prueba específica, tales como las pruebas de diagnóstico. Los componentes de un kit son un agente anti-GDF6 o un agente anti-SMAD 1/5/8 usado para probar GDF6 o SMAD 1/5/8, una muestra de control, y opcionalmente una composición para detectar GDF6 o SMAD1/5/8. Los ejemplos de agentes anti-GDF6 y anti-SMAD1/5/8 incluyen un anticuerpo anti-GDF6 o anti-SMAD1/5/8 o un fragmento del mismo; si está marcado, entonces un reactivo de detección de unión a GDF6 o SMAD1/5/8 es superfluo. Los ejemplos de reactivos de detección incluyen: anticuerpos secundarios marcados, por ejemplo, un anticuerpo policlonal anti-ratón producido en burro y después marcado con un fluoróforo tal como rodamina. Los componentes de control pueden incluir: suero normal del animal en el que se produjo un anticuerpo secundario; una solución que contiene polipéptido GDF6 y/o SMAD1/5/8; una transferencia en mancha de proteína GDF6 o SMAD 1/5/8 para analizar la reactividad del reactivo de unión a GDF6 o SMAD1/5/8. Otros componentes pueden incluir tampones, fijadores, soluciones de bloqueo, portaobjetos de microscopio y/o cubreobjetos u otros sustratos adecuados para el análisis, tales como placas de microtitulación; detergente o soluciones detergentes u otros reactivos permeabilizantes; reactivos misceláneos, inhibidores de proteasa, diversos contenedores y herramientas y equipos misceláneos para facilitar los ensayos.

En muchos casos, pueden ensamblarse kits especialmente convenientes no solo con los componentes enumerados anteriormente, sino también con medios para recolectar una muestra.

(a) Contenedores o recipientes

Los reactivos incluidos en los kits pueden suministrarse en contenedores de cualquier tipo de manera que la vida de los diferentes componentes se conservan y no se adsorben o alteran por los materiales del contenedor. Por ejemplo, ampollas de vidrio selladas pueden contener reactivos de unión a GDF6 o SMAD1/5/8 liofilizados (tales como anticuerpos anti-GDF6 o anti-SMAD1/5/8) o tampones que se han empacado bajo un gas no reactivo neutro, tal como nitrógeno. Las ampollas puede consistir en cualquier material adecuado, tal como vidrio, polímeros orgánicos (es decir, policarbonato, poliestireno, etc.), cerámica, metal o cualquier otro material que se emplea típicamente para contener los reactivos. Otros ejemplos de envases adecuados incluyen botellas simples que se pueden fabricar a partir de sustancias similares como ampollas y desarrollos que pueden tener interiores forrados de aluminio, tales como aluminio o aleación. Otros envases incluyen tubos de prueba, viales, frascos, botellas, jeringas, o similares. Los envases pueden tener un puerto de acceso estéril, tal como una botella que tiene un tapón que puede ser perforado por una aguja de inyección hipodérmica. Otros envases pueden tener dos compartimentos que se separan por una membrana fácilmente removible que tras la eliminación permite mezclar los componentes. Las membranas removibles pueden ser de vidrio, plástico, caucho, etc.

(b) Materiales de instrucción

Los kits pueden suministrarse además con los materiales de instrucción. Las instrucciones pueden imprimirse en papel u otro sustrato y/o pueden suministrarse como un medio de lectura electrónica, tal como un disquete, CD-ROM, DVD-ROM, DVD, cinta de video, cinta de audio, etc. Las instrucciones detalladas no pueden estar físicamente asociadas con el kit; en cambio, un usuario puede ser dirigido a un sitio web de internet especificado por el fabricante o distribuidor del kit, o suministrado como correo electrónico.

Métodos de la invención

La presente invención proporciona inhibidores de GDF6 para su uso en la intervención de un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno que se beneficiaría de la modulación de una molécula relacionada con melanoma. Los inhibidores de GDF6 son particularmente útiles para tratar sujetos que presentan melanoma.

5 Los efectos terapéuticos deseados incluyen una modulación de cualquier actividad asociada a la molécula relacionada con melanoma, como se describe en la presente descripción. Un efecto terapéutico preferido es la modulación de la expresión o actividad de la molécula relacionada con melanoma. Los efectos terapéuticos deseados también incluyen una disminución en la expresión de ARNm de la molécula relacionada con melanoma, los niveles de proteína de la molécula relacionada con melanoma o la actividad de la molécula relacionada con melanoma, como se describe en la presente descripción. Los efectos terapéuticos deseados también incluyen, entre otros, curar o sanar al sujeto, aliviar, atenuar, alterar o mejorar una enfermedad o trastorno en el sujeto o al menos un síntoma de dicha enfermedad o trastorno en el sujeto, o de cualquier otra manera mejorar o afectar la salud del sujeto.

10 Mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno que se trata de manera satisfactoria aunque se prefiere mejorar varios, si no todos, los síntomas de la enfermedad o trastorno.

Un aspecto destacado de la invención se refiere a métodos para modular las moléculas relacionadas con melanoma con fines terapéuticos.

20 Por lo tanto, la presente invención presenta métodos de tratamiento o métodos terapéuticos. Se describe un método para tratar un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano que lo necesita) con un compuesto modulador identificado de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, un modulador de molécula relacionado con el melanoma), de manera que se logre un efecto terapéutico deseado.

25 Además se describe un método para prevenir en un sujeto, el melanoma, mediante la administración al sujeto de un agente que modula la expresión o actividad de la molécula relacionada con melanoma. Los sujetos en riesgo de tales trastornos pueden identificarse, por ejemplo, mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción o cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la técnica. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos del melanoma, de manera que se prevenga una enfermedad o, alternativamente, se retrase su progresión.

30 Un compuesto que disminuye la expresión y/o actividad de una molécula relacionada con melanoma o la expresión y/o actividad de una molécula de unión relacionada con melanoma, puede usarse para tratar un sujeto. Los agentes para su uso pueden ser conocidos (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico con sentido o antisentido que codifican una molécula relacionada con melanoma o moléculas que interactúan o los polipéptidos que codifican) o pueden identificarse, por ejemplo, mediante el uso de los ensayos de tamizaje descritos en la presente descripción (por ejemplo, un antagonista de la molécula relacionada con melanoma, un peptidomimético de un antagonista de la molécula relacionada con melanoma, un peptidomimético de la molécula relacionada con melanoma u otra molécula pequeña).

40 Los métodos moduladores de la invención implican poner en contacto una célula con un agente que modula la actividad y/o expresión de una molécula relacionada con melanoma y/o una molécula interactuante con la molécula relacionada con melanoma.

45 Estos métodos moduladores pueden realizarse in vitro (por ejemplo, al poner en contacto la célula con el agente) o, alternativamente, in vivo (por ejemplo, al administrar el agente a un sujeto). Como tal, la presente invención proporciona métodos para tratar a un individuo afectado con una afección o trastorno que se beneficiaría de la modulación negativa de al menos una molécula relacionada con melanoma. En una modalidad, el método implica administrar un agente (por ejemplo, un agente identificado mediante un ensayo de detección descrito en la presente descripción), o una combinación de agentes que regulan negativamente la expresión y/o actividad de una molécula relacionada con melanoma.

50 **Sujetos y pacientes**

En un aspecto preferido, la invención presenta un método de tratamiento de un sujeto con melanoma.

55 La identificación o selección de un sujeto que lo necesite puede ser realizada por cualquier médico o investigador experto mediante el uso de habilidades o técnicas de diagnóstico reconocidas en la técnica.

La eficacia del tratamiento de un sujeto con un compuesto modulador de la invención puede controlarse (i) detectando el nivel de moléculas relacionadas con melanoma; (ii) detectando la presencia de una molécula relacionada con melanoma; (iii) comparando los niveles de moléculas relacionadas con melanoma antes de la administración y después de la administración; y (iv) alterando la administración del modulador al sujeto en consecuencia.

60 **Métodos terapéuticos**

65 **Anticuerpos de inhibición**

La presente invención también incluye un anticuerpo de inhibición de la molécula relacionada con melanoma o una porción biológicamente activa del mismo para su uso en métodos terapéuticos que comprenden administrar a un sujeto una dosis terapéuticamente eficaz, de manera que la actividad biológica de la molécula relacionada con melanoma en dicho sujeto disminuya a niveles detectables en individuos normales o de control. Los anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos monoclonales, incluidos monoclonales humanizados, quiméricos y humanos o fragmentos de los mismos. Para generar tales anticuerpos, puede usarse un fragmento de la molécula relacionada con melanoma proteolítico o sintético (solo o unido a un portador o hapteno adecuado) para inmunizar a un sujeto (por ejemplo, un mamífero que incluye, pero no se limita a un conejo, cabra, ratón u otro mamífero). Por ejemplo, pueden usarse los métodos descritos en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,422,110; 5,837,268; 5,708,155; 5,723,129; y 5,849,531. La preparación inmunogénica puede incluir además un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación de fragmento de la molécula relacionada con melanoma proteolítico o sintético inmunogénico induce una respuesta de anticuerpo policlonal anti-molécula relacionada con melanoma. El título de anticuerpos anti-molécula relacionada con melanoma en el sujeto inmunizado puede monitorearse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tal como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) mediante el uso de moléculas relacionadas con melanoma inmovilizadas. Subsecuentemente, los sueros de los sujetos inmunizados pueden analizarse para determinar su actividad inhibitoria mediante el uso de cualquiera de los bioensayos descritos en la presente descripción.

Alternativamente, también es posible inmunizar sujetos con plásmidos que expresan una molécula relacionada con melanoma mediante el uso de la tecnología de inmunización de ADN, tal como la descrita en la patente de los Estados Unidos núm. 5,795,872, Ricigliano y otros, "DNA construct for immunization" (1998), y en la patente de Estados Unidos núm. 5,643,578, Robinson y otro, "Immunization by inoculation of DNA transcription unit" (1997).

Las moléculas de anticuerpos dirigidas contra una molécula relacionada con melanoma pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tal como la cromatografía de proteína A para obtener la fracción de IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos son más altos, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos del sujeto y usarlas para preparar, por ejemplo, anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497 (ver también, Brown y otros (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown y otros (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh y otros (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; y Yeh y otros (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica más reciente de hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros (1983) *Immunol Today* 4:72), la técnica EBV-hibridoma (Cole y otros (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales es bien conocida (ver generalmente R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, N.Y. (1980); E. A. Lemer (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Geffer y otras (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). En resumen, una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) se fusiona con linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno de la molécula relacionada con melanoma como se describió anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se tamizan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a una molécula relacionada con melanoma. Cualquiera de los muchos protocolos conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas puede aplicarse con el fin de generar un anticuerpo monoclonal anti-molécula relacionada con melanoma (ver, por ejemplo, G. Galfre y otros (1977) *Nature* 266:55052; Geffer y otros *Somatic Cell Genet.*, citado más arriba; Lemer, *Yale J. Biol. Med.*, citado más arriba; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citado más arriba). Además, el trabajador experto apreciará que existen muchas variaciones de tales métodos que también serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas murinos pueden prepararse fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Cualquiera de una serie de líneas celulares de mieloma puede usarse como una pareja de fusión de acuerdo con técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles en Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Rockville, MD). Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan a esplenocitos de ratón mediante el uso de polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan después mediante el uso de medio HAT, que mata las células de mieloma no fusionadas y fusionadas de manera no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no se transforman). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan al tamizar los sobrenadantes de cultivo de hibridoma en busca de anticuerpos que se unan a la molécula relacionada con melanoma, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo ELISA estándar. A continuación, los anticuerpos pueden analizarse para determinar la actividad inhibitoria de la molécula relacionada con melanoma mediante el uso de, por ejemplo, los ensayos descritos en la presente descripción.

Se describe un método que implica administrar a un tejido o línea celular aislada del sujeto un compuesto modulador identificado de acuerdo con la metodología descrita en la presente descripción, de manera que se logre el efecto deseado. Además, se describe un método que implica modificar genéticamente un tejido o línea celular, por ejemplo, un tejido o línea celular de un sujeto o paciente, de manera que la expresión o actividad de la molécula relacionada con melanoma disminuya.

Moléculas de ácido nucleico antisentido

La presente invención también incluye una molécula de ácido nucleico antisentido de la molécula relacionada con melanoma que es complementaria a un gen que codifica una molécula relacionada con melanoma o una porción de dicho gen, o un vector de expresión recombinante que codifica dicha molécula de ácido nucleico antisentido para su uso en métodos terapéuticos que comprenden administrar a un sujeto una dosis terapéuticamente eficaz. El uso de ácidos nucleicos antisentido para regular negativamente la expresión de una proteína particular en una célula es bien conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Weintraub, H. y otros, *Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis*, *Reviews--Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986; Askari, F. K. y McDonnell, W. M. (1996) *N. Eng. J. Med.* 334:316-318; Bennett, M. R. y Schwartz, S. M. (1995) *Circulation* 92:1981-1993; Mercola, D. y Cohen, J. S. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:47-59; Rossi, J. J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51:217-225; Wagner, R. W. (1994) *Nature* 372:333-335). Una molécula de ácido nucleico antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la cadena de codificación de otra molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ARNm) y en consecuencia es capaz de unirse por hidrógeno a la cadena de codificación de la otra molécula de ácido nucleico. Las secuencias antisentido complementarias a una secuencia de un ARNm pueden ser complementarias a una secuencia encontrada en la región de codificación del ARNm, la región no traducida 5' o 3' del ARNm o una región que enlaza la región de codificación y una región no traducida (por ejemplo, en la unión de la región no traducida 5' y la región de codificación). Además, un ácido nucleico antisentido puede ser complementario en secuencia a una región reguladora del gen que codifica el ARNm, por ejemplo, una secuencia de iniciación de la transcripción o elemento regulador. Preferentemente, un ácido nucleico antisentido se diseña para que sea complementario a una región que precede o abarca el codón de iniciación en la cadena de codificación o en la región 3' no traducida de un ARNm.

Dadas las secuencias de cadena de codificación que codifican las moléculas relacionadas con melanoma que se conocen en la técnica, los ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden diseñarse de acuerdo con las reglas del apareamiento de bases de Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a toda la región de codificación de un ARNm de la molécula relacionada con melanoma, pero con mayor preferencia es un oligonucleótido que es antisentido solo para una porción de la región codificante o no codificante de un ARNm de molécula relacionada con melanoma. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción de una ARNm de la molécula relacionada con melanoma. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Puede construirse un ácido nucleico antisentido de la invención mediante el uso de reacciones de síntesis química y ligadura enzimática mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente mediante el uso de nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de forma variada diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, pueden usarse ácidos nucleicos, por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente mediante el uso de un vector de expresión en el que se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado tendrá una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico objetivo de interés, descrito más adelante en la siguiente subsección).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se administran típicamente a un sujeto o se generan in situ de manera que se hibridan con o se unen al ARNm celular y/o al ADN genómico que codifica una molécula relacionada con melanoma o una proteína de la molécula que interactúa con la molécula relacionada con melanoma para inhibir así la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser por complementariedad de nucleótidos convencional para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a los dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice. Un ejemplo de una ruta de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención incluye inyección directa en un sitio de tejido. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden modificarse para dirigirse a células seleccionadas y después administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de manera que se unan específicamente a los receptores o antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, al unir las moléculas de ácido nucleico antisentido a los péptidos o anticuerpos que se unen a los receptores o antígenos de la superficie celular. Las moléculas de ácido nucleico antisentido también pueden administrarse a las células mediante el uso de los vectores descritos en la presente descripción. Para lograr concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren constructos de vectores en las que la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un fuerte promotor pol II o pol III.

Aún en otra modalidad, la molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico α -anomérico. Una molécula de ácido nucleico α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con el ARN complementario en el que, al contrario de las unidades β habituales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier y otros (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue y otros (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o un análogo quimérico de ARN-ADN (Inoue y otros (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

En otra modalidad, un ácido nucleico antisentido de la invención es un compuesto que media ARNi. Los agentes de interferencia de ARN incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ácido nucleico que incluyen moléculas de ARN que son homólogas al gen diana o la secuencia genómica, por ejemplo, una molécula relacionada con melanoma, o un fragmento de la misma, "ARN de interferencia corto" (ARNip), "horquilla corta" o "ARN de horquilla pequeña" (ARNhp), y moléculas pequeñas que interfieren o inhiben la expresión de un gen diana por interferencia de ARN (ARNi). La interferencia de ARN es una técnica de silenciamiento génico dirigida postranscripcional que usa ARN bicatenario (ARNbc) para degradar el ARN mensajero (ARNm) que contiene la misma secuencia que el ARNbc (Sharp, P.A. y Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., y otros *Cell* 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. y otros *Genes Dev.* 13, 3191-3197 (1999)). El proceso ocurre cuando una ribonucleasa endógena escinde el ARNbc más largo en ARN más cortos, ARN de 21 o 22 nucleótidos de longitud, denominados ARN de interferencia pequeños o ARNip. Los segmentos de ARN más pequeños median la degradación del ARNm diana. Los kits para la síntesis de ARNi están disponibles comercialmente en, por ejemplo, New England Biolabs (Ipswich, MA) y Ambion/Life Technologies (Grand Island, NY). En una modalidad, pueden emplearse una o más de las químicas descritas anteriormente para su uso en el ARN antisentido.

En aún otra modalidad, un ácido nucleico antisentido de la invención es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad de ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, en el que tienen una región complementaria. Por lo tanto, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach, 1988, *Nature* 334:585-591) puede usarse para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm de la molécula relacionada con melanoma para inhibir de ese modo la traducción de una ARNm de la molécula relacionada con melanoma. Una ribozima que tenga especificidad por un ácido nucleico que codifique una molécula relacionada con melanoma puede ser diseñada en base a la secuencia de nucleótidos u otra molécula de ácido nucleico que codifique otro polipéptido de una molécula relacionada con melanoma por un experto en la técnica. Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos a escindir en un ARNm que codifica una molécula relacionada con melanoma. Ver, por ejemplo, Cech y otros patente de Estados Unidos núm. 4,987,071; y Cech y otros patente de Estados Unidos núm. 5,116,742. Alternativamente, puede usarse una ARNm de la molécula relacionada con melanoma para seleccionar un ARN catalítico que tiene una actividad de ribonucleasa específica de un grupo de moléculas de ARN. Ver, por ejemplo, Bartel, D. y Szostak, J. W., 1993, *Science* 261:1411-1418.

Alternativamente, la expresión génica puede inhibirse dirigiéndose a secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de una molécula relacionada con melanoma (por ejemplo, el promotor y/o potenciadores de la molécula relacionada con melanoma) para formar estructuras helicoidales triples que impidan la transcripción de un gen de la molécula relacionada con melanoma en las células diana. Ver generalmente, Helene, C., 1991, *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, C. y otros, 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher, L. J., 1992, *Bioensayos* 14(12):807-15.

En aún otra modalidad, las moléculas de ácido nucleico de la molécula relacionada con melanoma de la presente invención pueden modificarse en el resto de base, resto de azúcar o cadena principal de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la cadena principal de fosfato de desoxirribosa de las moléculas de ácido nucleico puede modificarse para generar ácidos nucleicos peptídicos Hyrup B. y otros, 1996, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4 (1): 5-23). Como se usa en la presente descripción, los términos "ácidos nucleicos peptídicos" o "PNA" se refieren a miméticos de ácido nucleico por ejemplo, miméticos de ADN, en el que la cadena principal de fosfato de desoxirribosa se reemplaza por una cadena principal de pseudopéptido y solo se conservan las cuatro nucleobases naturales. La cadena principal neutra de los PNA puede permitir una hibridación específica con el ADN y el ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA puede realizarse mediante el uso de protocolos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida como se describe, por ejemplo, en Hyrup B. y otros, 1996, más arriba; Perry-O'Keefe y otros, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675.

Los PNA de las moléculas de ácido nucleico de la molécula relacionada con melanoma pueden usarse en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, los PNA pueden usarse como agentes antisentido o antígeno para la modulación específica de secuencia de la expresión génica, por ejemplo, induciendo el arresto de la transcripción o la traducción o inhibiendo la replicación. Los PNA de las moléculas de ácido nucleico de la molécula relacionada con melanoma también pueden usarse en el análisis de mutaciones de pares de bases únicas en un gen (por ejemplo, mediante bloqueo en PCR dirigido por PNA); como 'enzimas de restricción artificiales' cuando se usan en combinación con otras enzimas (por ejemplo, nucleasas S1 (Hyrup y otros, 1996 más arriba)) o como sondas o cebadores para la secuenciación o hibridación de ADN (Hyrup y otros, 1996, más arriba; Perry-O'Keefe más arriba).

En otra modalidad, los PNA de una molécula relacionada con melanoma pueden modificarse (por ejemplo, para mejorar su estabilidad o captación celular), uniendo grupos lipofílicos u otros grupos auxiliares al PNA, mediante la formación de quimeras de ADN-PNA, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de suministro de fármacos conocidas en la

técnica. Por ejemplo, pueden generarse quimeras de ADN-PNA de moléculas de ácido nucleico de la molécula relacionada con melanoma que pueden combinar las propiedades ventajosas de PNA y ADN. Tales quimeras permiten que las enzimas de reconocimiento de ADN (por ejemplo, ARNasa H y ADN polimerasas) interactúen con la porción de ADN, mientras que la porción de PNA proporcionaría una alta afinidad y especificidad de unión. Las quimeras de ADN-PNA pueden unirse mediante el uso de enlazadores de longitudes apropiadas seleccionadas en términos de apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases y orientación (Hyrup B., 1996, más arriba). La síntesis de quimeras de ADN-PNA puede realizarse como se describe en Hyrup B., 1996, más arriba y Finn P.J. y otros, 1996, *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63. Por ejemplo, una cadena de ADN puede sintetizarse sobre un soporte sólido mediante el uso de química de acoplamiento de fosforamidita estándar y análogos de nucleósidos modificados, por ejemplo, 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita, puede usarse como un PNA y el extremo 5' del ADN (Mag, M. y otros, 1989, *Nucleic Acid Res.* 17: 5973-88). Los monómeros de PNA se acoplan después de manera gradual para producir una molécula quimérica con un segmento de PNA 5' y un segmento de ADN 3' (Finn P. J. y otros, 1996, más arriba). Alternativamente, las moléculas quiméricas pueden sintetizarse con un segmento de ADN 5' y un segmento PNA 3' (Peterser, K. H. y otros, 1975, *Bioorganic Med. Chem Lett.* 5: 1119-11124).

En otras modalidades, el oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para el direccionamiento de receptores de células huésped in vivo), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger y otros, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 86:6553-6556; Lemaire y otros, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; publicación PCT núm. WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, publicación PCT núm. WO89/10134). Además, los oligonucleótidos pueden modificarse con agentes de escisión activados por hibridación (ver, por ejemplo, Krol y otros, 1988, *Bio-Techniques* 6: 958-976) o agentes intercalantes. (Ver, por ejemplo, Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5:539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse a otra molécula, por ejemplo, un cromóforo, fluoróforo, péptido, agente de entrecruzamiento activados por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activado por hibridación).

Los polinucleótidos antisentido pueden producirse a partir de un casete de expresión heterólogo en una célula transfectante o una célula transgénica. Alternativamente, los polinucleótidos antisentido pueden comprender oligonucleótidos solubles que se administran al medio externo, ya sea en el medio de cultivo in vitro o en el sistema circulatorio o en fluido intersticial in vivo. Se ha demostrado que los polinucleótidos antisentido solubles presentes en el medio externo obtienen acceso al citoplasma e inhiben la traducción de especies de ARNm específicas.

La invención presenta vectores de expresión para la transfección y expresión in vivo o in vitro de una molécula relacionada con melanoma (o una porción biológicamente activa de la misma) en tipos de células particulares para disminuir la actividad de al menos una molécula relacionada con melanoma en dicha célula. Los constructos de expresión que codifican una molécula relacionada con melanoma antisentido pueden administrarse en cualquier portador biológicamente eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de suministrar eficazmente el gen recombinante a las células in vivo. Los enfoques incluyen la inserción del ADN que codifica un antisentido de una molécula relacionada con melanoma en vectores virales que incluyen retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociado y virus del herpes simple-1, o plásmidos bacterianos o eucarióticos recombinantes. Los vectores virales infectan las células directamente; el ADN plasmídico puede suministrarse con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o derivatizase (por ejemplo, conjugado de anticuerpos), conjugados de polilisina, gramacidina S, envolturas virales artificiales u otros portadores intracelulares tales, así como también la inyección directa de la constructo génico o la precipitación con Ca_2PO_4 realizada in vivo. Se apreciará que debido a que la transducción de células diana apropiadas representa la primera etapa crítica en la terapia génica, la elección del sistema de suministro génico particular dependerá de factores tales como el fenotipo de la diana deseada y la vía de administración, por ejemplo, localmente o sistémicamente. Además, se reconocerá que los constructos génicos particulares proporcionados para la transducción in vivo de la expresión de moléculas relacionadas con melanoma también son útiles para la transducción in vitro de células, tal como para su uso en los sistemas de cultivo de tejidos ex vivo descritos más adelante.

Un enfoque preferido para la introducción in vivo de ácido nucleico en una célula es mediante el uso de un vector viral que contiene el ácido nucleico deseado. La infección de las células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de las células dirigidas puede recibir el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, por un ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficientemente en células que han captado el ácido nucleico del vector viral.

Se entienden generalmente que los vectores de retrovirus y los vectores de virus adenoasociados son el sistema de suministro de genes recombinantes de elección para la transferencia de genes exógenos in vivo, particularmente en seres humanos. Estos vectores proporcionan un suministro eficiente de genes a las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de manera estable en el ADN cromosómico del huésped. Un requisito previo importante para el uso de retrovirus es garantizar la seguridad de su uso, particularmente con respecto a la posibilidad de propagación del virus de tipo silvestre en la población celular. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células de empaquetamiento") que producen solo retrovirus con replicación defectuosa ha aumentado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica, y los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia génica con fines de terapia génica (para una revisión ver Miller (1990) *Blood* 76:271). Por lo tanto, puede construirse un retrovirus recombinante en el que parte de la secuencia de codificación retroviral (gag, pol, env) se ha reemplazado por un ácido nucleico que codifica una de las proteínas del sujeto que hace que la replicación del retrovirus sea defectuosa. El retrovirus

con replicación defectuosa se empaqueta después en viriones que pueden usarse para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar mediante técnicas estándar. Pueden encontrarse protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células in vitro o in vivo con tales virus en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. y otros (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio estándar.

5 Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de líneas adecuadas de virus de empaquetamiento para preparar ambos sistemas retrovirales ecotrópicos y anfotrópicos incluyen psi.Crip., psi.Cre., psi.2 y psi.Am. Los retrovirus se han usado para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluidas las células neuronales, in vitro y/o in vivo (ver, por ejemplo, Eglitis, y otros (1985) Science 230:1395-1398; Danos y Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano y otros (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber y otros (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry y otros (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury y otros (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem y otros (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay y otros (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai y otros (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu y otros (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; patente de Estados Unidos núm. 4,868,116; patente de Estados Unidos núm. 4,980,286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573). Además, se ha demostrado que es posible limitar el espectro de infección de los retrovirus y, en consecuencia, de los vectores retrovirales, modificando las proteínas de empaquetamiento virales en la superficie de la partícula viral (ver, por ejemplo, las publicaciones PCT WO93/25234 y WO94/06920). Por ejemplo, las estrategias para la modificación del espectro de infección de los vectores retrovirales incluyen: acoplar anticuerpos específicos para antígenos de la superficie celular a la proteína env viral (Roux y otros (1989) PNAS 86:9079-9083; Julan y otros (1992) J Gen Virol 73:3251-3255; y Goud y otros (1983) Virology 163:251-254); o acoplar ligandos de receptor de superficie celular a las proteínas env virales (Neda y otros (1991) J Biol Chem 266:14143-14146). El acoplamiento puede estar en forma de reticulación química con una proteína u otra variedad (por ejemplo, lactosa para convertir la proteína env en una asialoglicoproteína), así como también mediante la generación de proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de anticuerpo de cadena única/env). Esta técnica, si bien es útil para limitar o de cualquier otra manera dirigir la infección a ciertos tipos de tejidos, también puede usarse para convertir un vector ecotrópico en un vector anfotrópico.

Además, el uso del suministro de genes retrovirales puede mejorarse aún más mediante el uso de secuencias reguladoras de la transcripción específicas de tejidos o células que controlan la expresión de un gen de la molécula relacionada con melanoma del vector retroviral.

Otro sistema de suministro de genes virales útil en la presente invención utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus puede manipularse de manera que codifique y exprese un producto génico de interés pero se inactiva en términos de su capacidad de replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Ver, por ejemplo, Berkner y otros (1988) Biotechniques 6:616; Rosenfeld y otros (1991) Science 252:431-434; y Rosenfeld y otros (1992) Cell 68:143-155.

35 Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias, ya que pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluido el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld y otros (1992) citado más arriba), células endoteliales (Lemarchand y otros (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6482-6486), adipocitos (Hertzel y otros (2000) J Lipid Res. 41:1082-1086), hepatocitos (Herz y Gerard (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816) y las células musculares (Quantin y otros (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-2584). Además, la partícula viral es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como anteriormente, puede modificarse para afectar el espectro de infectividad. Adicionalmente, el ADN adenoviral introducido (y el ADN extraño contenido en él) no está integrado en el genoma de una célula huésped, sino que permanece episomal, evitando así los posibles problemas que pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis de inserción en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Además, la capacidad de carga del genoma adenoviral para el ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) con relación a otros vectores de suministro génico (Berkner y otros citado más arriba; Haj-Ahmand y Graham (1986) J. Virol. 57:267). La mayoría de los vectores adenovirales con replicación defectuosa actualmente en uso y, por lo tanto, favorecidos por la presente invención, se delecionan para todos o partes de los genes virales E1 y E3, pero retienen hasta el 80 % del material genético adenoviral (ver, por ejemplo, Jones y otros (1979) Cell 16:683; Berkner y otros, más arriba; y Graham y otros en Methods in Molecular Biology, E. J. Murray, Ed. (Humana, Clifton, N.J., 1991) vol. 7. pp. 109-127). La expresión del gen de la molécula relacionada con melanoma insertado puede estar bajo el control de, por ejemplo, el promotor E1A, el promotor tardío principal (MLP) y las secuencias líderes asociadas, el promotor E3 o secuencias promotoras añadidas exógenamente.

Aún otro sistema de vectores virales útil para el suministro del ADN que codifica una molécula relacionada con melanoma antisentido es el virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado es un virus defectuoso de origen natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para una replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión ver Muzyczka y otros (1992) Curr. Topics in Micro. and Immunol. 158:97-129). También es uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no se dividen, y exhibe una alta frecuencia de integración estable (ver por ejemplo Flotte y otros (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski y otros (1989) J. Virol. 63:3822-3828; y McLaughlin y otros (1989) J. Virol. 62:1963-1973). Los vectores que contienen tan solo 300 pares de bases de AAV pueden empaquetarse y pueden integrarse. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector de AAV tal como el descrito en Tratschin y otros (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 puede usarse para introducir ADN en las células. Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos

de células mediante el uso de vectores AAV (ver, por ejemplo, Hermonat y otros (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470; Tratschin y otros (1985) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081; Wondisford y otros (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschiny otros (1984) J. Virol. 51:611-619; y Flotte y otros (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790).

5 Además de los métodos de transferencia viral, como los ilustrados anteriormente, también pueden emplearse métodos no virales para provocar la expresión de una molécula relacionada con melanoma antisentido (o una porción biológicamente activa de la misma) en el tejido de un animal. La mayoría de los métodos no virales de transferencia de genes se basan en mecanismos normales usados por las células de mamíferos para la absorción y el transporte intracelular de macromoléculas. En modalidades preferidas, los sistemas de suministro de genes no virales de la presente invención se basan en rutas endocíticas para la absorción del ADN que codifica la molécula relacionada con melanoma sujeto por la célula dirigida. Los sistemas ilustrativos de suministro génico de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de poli-lisina y envolturas virales artificiales.

15 En entornos clínicos, los sistemas de suministro génico para la administración terapéutica de moléculas relacionadas con melanoma antisentido pueden introducirse en un paciente mediante cualquiera de varios métodos, cada uno de los cuales es familiar en la técnica. Por ejemplo, una preparación farmacéutica del sistema de suministro génico puede introducirse sistémicamente, por ejemplo, por inyección intravenosa. En este caso, la transducción específica de la proteína en las células diana surge de la especificidad de la transfección proporcionada por el vehículo de suministro génico (es decir, especificidad de tipo celular o de tipo tisular debido a secuencias reguladoras transcripcionales que controlan la expresión génica recombinante). En otras modalidades, el suministro inicial del gen recombinante está más limitado con la introducción en el animal bastante localizada. Por ejemplo, el vehículo de suministro génico puede introducirse por catéter (ver la patente de Estados Unidos núm. 5,328,470) o por inyección estereotáctica (por ejemplo Chen y otros (1994) PNAS 91: 3054-3057). El ADN que codifica una molécula relacionada con melanoma (o una porción biológicamente activa de la misma), puede administrarse en una constructo de terapia génica mediante electroporación mediante el uso de técnicas descritas, por ejemplo, por Dev y otros ((1994) Cancer Treat Rev 20:105-115).

30 La presente invención también incluye un compuesto de ADN plasmídico desnudo (como se enseña, por ejemplo, en Wolff y otros, (1990) Science 247:1465-1468) para su uso en terapia que comprende inyectar un área del cuerpo de un sujeto con una cantidad eficaz. Un compuesto de ADN plasmídico desnudo comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula deseada o una porción biológicamente activa de la misma, unida operativamente a un vector de ADN plasmídico desnudo capaz de ser absorbido y expresado en una célula receptora ubicada en el área del cuerpo. Los vectores de ADN plasmídico desnudos preferidos de la presente invención incluyen los conocidos en la técnica. Cuando se administra a un sujeto, un compuesto de ADN plasmídico desnudo de la presente invención transforma las células dentro del sujeto y dirige la producción de la molécula relacionada con melanoma antisentido, o porción biológicamente activa de la misma, en la célula.

35 Como se usa en la presente descripción, una cantidad eficaz de un ADN plasmídico desnudo para administrar a un sujeto comprende una cantidad necesaria para aliviar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno que se trata y, preferentemente, es una cantidad suficiente para prevenir o curar la enfermedad o trastorno. El modo de administración, el número de dosis y la frecuencia de dosis pueden ser decididos, en cualquier situación dada, por un experto en la técnica sin recurrir a una experimentación excesiva.

45 En una modalidad, se introduce un vector de expresión recombinante en la célula, el vector contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la molécula antisentido relacionada con melanoma. El término "vector" significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un vector preferido es un "vector de expresión" que es capaz de dirigir la expresión del gen contenido en él. Generalmente, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más usada. Sin embargo, la invención se destina a incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes. En una modalidad preferida, la ingeniería genética es de un sujeto o de las propias células del paciente que se aíslan del sujeto o del cuerpo del paciente, transfectadas o infectadas de acuerdo con las técnicas descritas en detalle en la presente descripción, y reintroducidas o devueltas al cuerpo del sujeto o paciente.

55 Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células huésped a usar para la expresión, que está operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" significa que la secuencia de nucleótidos de interés se une a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción in vitro o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (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). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseada, y similares.

5 Cuando se usa en células de mamífero, por ejemplo, células humanas, las funciones de control del vector de expresión frecuentemente son proporcionadas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente se derivan de poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus del Simio 40. Alternativamente, los elementos reguladores específicos de tejido se usan para controlar la expresión del ácido nucleico deseado. Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Los promotores preferidos específicos de tejido incluyen promotores
10 específicos de piel.

El ADN vectorial puede introducirse mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluida la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro
15 de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook y otros (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y otros manuales de laboratorio.

20 Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, en dependencia del vector de expresión y la técnica de transfección usada, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico
25 que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica la proteína de la molécula relacionada con melanoma o puede introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante la selección del fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).

30 La invención también proporciona la reducción de la expresión y/o actividad de una molécula relacionada con melanoma en una célula que utiliza un anticuerpo intracelular específico para una molécula relacionada con melanoma analizada en la presente descripción. El uso de anticuerpos intracelulares para inhibir la función de la proteína en una célula es conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Carlson, J. R. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2638-2646; Biocca, S. y otros (1990) EMBO J. 9:101-108; Werge, T.M. y otros (1990) FEBS Letters 274:193-198; Carlson, J.R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7427-7428; Marasco, W.A. y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893; Biocca, S. y otros (1994) Bio/Technology 12:396-399; Chen, S-Y. y otros (1994) Human Gene Therapy 5:595-601; Duan, L y otros (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5075-5079; Chen, S-Y. y otros (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5932-5936; Beerli, R.R. y otros (1994) J. Biol. Chem. 269:23931-23936; Beerli, R.R. y otros (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-672; Mhashilkar, A.M. y otros (1995) EMBO J. 14:1542-1551; Richardson, J.H. y otros (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; publicación PCT núm. WO 94/02610 por Marasco y otros; y publicación PCT núm. WO 95/03832 por Duan y otros).

Para inhibir la actividad de la proteína mediante el uso de un anticuerpo intracelular, se prepara un vector de expresión recombinante que codifica las cadenas de anticuerpos en una forma de manera que, tras la introducción del vector en una
45 célula, las cadenas de anticuerpos se expresan como un anticuerpo funcional en un compartimento intracelular del célula. Para la inhibición de la actividad del factor de transcripción de acuerdo con los métodos inhibitorios de la invención, preferentemente un anticuerpo intracelular que se une específicamente al factor de transcripción se expresa dentro del núcleo de la célula. La expresión nuclear de un anticuerpo intracelular puede lograrse eliminando de los genes de la cadena ligera y pesada del anticuerpo aquellas secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias líder hidrófobas del extremo N-terminal y añadiendo secuencias de nucleótidos que codifican una señal de localización nuclear en el
50 extremo N o C de los genes de la cadena ligera y pesada (ver, por ejemplo, Biocca, S. y otros (1990) EMBO J. 9:101-108; Mhashilkar, A. M. y otros (1995) EMBO J. 14:1542-1551). Una señal de localización nuclear preferida para ser usada para el direccionamiento nuclear de las cadenas de anticuerpos intracelulares es la señal de localización nuclear del antígeno T Grande de SV40 (ver Biocca, S. y otros (1990) EMBO J. 9:101-108; Mhashilkar, A. M. y otros (1995) EMBO J. 14:1542-1551).

Para preparar un vector de expresión de anticuerpo intracelular, se aíslan los ADNc de cadena ligera y pesada de anticuerpo que codifican cadenas de anticuerpo específicas para la proteína diana de interés, por ejemplo, una proteína de la molécula relacionada con melanoma, típicamente de un hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal específico
60 para una proteína de la molécula relacionada con melanoma. Por ejemplo, los anticuerpos pueden prepararse inmunizando un sujeto adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con un inmunógeno de proteína de la molécula relacionada con melanoma. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, una proteína de molécula relacionada con melanoma expresada por vía recombinante o un péptido de molécula relacionada con melanoma sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como adyuvante
65 completo o incompleto de Freund, o un compuesto inmunoestimulador similar. Las células productoras de anticuerpos

pueden obtenerse del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma como se describe anteriormente en la presente descripción.

5 Alternativa a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal que se une a una molécula relacionada con melanoma puede identificarse y aislarse mediante el tamizaje de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos) con la proteína, o un péptido de la misma para aislar de este modo los miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen específicamente a la proteína. Los kits para generar y tamizar bibliotecas de presentación de fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, núm. de Catalog 27-9400-01; y el Stratagene SurfZAP.TM. Phage Display Kit, núm. de catálogo 240612). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de métodos y compuestos particularmente susceptibles para su uso en la generación y tamizaje de la biblioteca de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, Ladner y otros patente de Estados Unidos núm. 5,223,409; Kang y otros publicación internacional núm. WO 92/18619; Dower y otros publicación internacional núm. WO 91/17271; Winter y otros publicación internacional núm. WO 92/20791; Markland y otros publicación internacional núm. WO 92/15679; Breitling y otros publicación internacional WO 93/01288; McCafferty y otros publicación internacional núm. WO 92/01047; Garrard y otros publicación internacional núm. WO 92/09690; Fuchs y otros (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay y otros (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse y otros (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths y otros (1993) EMBO J. 12: 725-734; Hawkins y otros (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clarkson y otros (1991) Nature 352: 624-628; Gram y otros (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrad y otros (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom y otros (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; Barbas y otros (1991) PNAS 88:7978-7982; y McCafferty y otros Nature (1990) 348:552-554.

25 Una vez que se ha identificado un anticuerpo monoclonal de interés específico para una molécula relacionada con melanoma (por ejemplo, ya sea un anticuerpo monoclonal derivado de hibridoma o un anticuerpo recombinante de una biblioteca combinatoria, incluidos los anticuerpos monoclonales contra una molécula relacionada con melanoma que ya se conocen en la técnica), los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal se aíslan mediante técnicas estándar de biología molecular. Para los anticuerpos derivados de hibridoma, pueden obtenerse los ADNc de cadena ligera y pesada, por ejemplo, mediante amplificación por PCR o tamizaje de biblioteca de ADNc. Para los anticuerpos recombinantes, tales como los de una biblioteca de presentación de fagos, el ADNc que codifica las cadenas ligeras y pesadas puede recuperarse del paquete de presentación (por ejemplo, fagos) aislado durante el proceso de tamizaje de la biblioteca. Se conocen en la técnica las secuencias de nucleótidos de genes de cadena ligera y pesada de anticuerpos a partir de los cuales pueden prepararse cebadores para PCR o sondas para biblioteca de ADNc. Por ejemplo, muchas de estas secuencias se describen en Kabat, E. A., y otros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH núm. 91-3242 y en la base de datos de secuencia de líneas germinales humanas "Vbase".

35 Una vez obtenidas, las secuencias de cadena ligera y pesada del anticuerpo se clonan en un vector de expresión recombinante mediante el uso de métodos estándar. Como se discutió anteriormente, las secuencias que codifican los líderes hidrófobos de las cadenas ligeras y pesadas se eliminan y las secuencias que codifican una señal de localización nuclear (por ejemplo, del antígeno T grande de SV40) se unen en el marco a secuencias que codifican el extremo amino o carboxilo tanto de las cadenas ligeras como de las pesadas. El vector de expresión puede codificar un anticuerpo intracelular en una de varias formas diferentes. Por ejemplo, en una modalidad, el vector codifica cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos de longitud completa de manera que un anticuerpo de longitud completa se expresa intracelularmente. En otra modalidad, el vector codifica una cadena ligera de longitud completa pero solo la región VH/CH1 de la cadena pesada de manera que un fragmento Fab se expresa intracelularmente. En la modalidad más preferida, el vector codifica un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) en donde las regiones variables de las cadenas ligera y pesada se unen por un enlazador peptídico flexible (por ejemplo, (Gly₄Ser₃) y se expresan como una molécula de cadena única. Para inhibir la actividad del factor de transcripción en una célula, el vector de expresión que codifica el anticuerpo intracelular específico de NIP45 se introduce en la célula mediante métodos de transfección estándar como se describe anteriormente en la presente descripción.

50 Compuestos peptídicos

En otra modalidad, un compuesto inhibidor de la invención es un compuesto peptídico derivado de una secuencia de aminoácidos de la molécula relacionada con melanoma. En particular, el compuesto inhibidor comprende una porción de una molécula relacionada con melanoma (o un imitador de la misma) que media la interacción de una molécula relacionada con melanoma con una molécula diana de manera que el contacto de la molécula relacionada con melanoma con este compuesto peptídico inhibe competitivamente la interacción de la molécula relacionada con melanoma con la molécula diana.

60 Los compuestos peptídicos de la invención pueden prepararse intracelularmente en células inmunitarias introduciendo en las células inmunes un vector de expresión que codifica el péptido. Tales vectores de expresión pueden prepararse mediante técnicas estándar. El péptido puede expresarse intracelularmente como una fusión con otra proteína o péptido (por ejemplo, una fusión GST). Alternativa a la síntesis recombinante de los péptidos en las células, los péptidos pueden prepararse mediante síntesis química mediante el uso de técnicas estándar de síntesis de péptidos. Los péptidos sintetizados pueden después introducirse en las células mediante una variedad de medios conocidos en la técnica para

introducir péptidos en las células (por ejemplo, liposomas y similares) o administrarse a un sujeto mediante el uso de cualquier vía de administración adecuada.

Polipéptidos receptores solubles y fusiones de Fc

Los polipéptidos receptores solubles pueden ser antagonistas eficaces de GDF6. Por ejemplo, una porción soluble de un polipéptido se une a GDF6, inhibiendo o reduciendo así una actividad de GDF6. Tales moléculas pueden proporcionarse como un péptido de fusión junto con un segundo péptido que promueve la solubilidad. Para ilustrar, puede proporcionarse un péptido soluble como parte de un polipéptido de fusión con todo o un fragmento de la bisagra o porción Fc de la inmunoglobulina, lo que puede promover la solubilidad y/o la estabilidad del suero. En ciertas modalidades, esto puede incluir proteínas de fusión de los mismos, por ejemplo, polipéptido de fusión Fc del receptor GDF6 soluble, también conocido como "GDF6-TRAP" (publicación de solicitud de patente internacional WO2010114860).

En algunas modalidades, los polipéptidos ALK3 solubles pueden usarse para inhibir una actividad de la molécula relacionada con melanoma, tal como GDF6. "ALK3" se refiere a una familia de proteínas quinasas similares al receptor de activina 3 (ALK3) (también denominado receptor de proteína morfogenética ósea, tipo IA (BMPR1A), o proteínas del receptor de activina A, quinasa similar a tipo II (ACVRLK) de cualquier especie y variantes derivadas de tales proteínas ALK3 por mutagénesis u otra modificación. Los miembros de la familia ALK3 son generalmente proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina quinasa predicha. "Polipéptido de ALK3 soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ALK3. El término "polipéptido de ALK3 soluble" incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ALK3, así como también cualquier variante de la misma (incluidos mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). La referencia a ALK3 se refiere a cualquiera de las formas identificadas actualmente.

El término "polipéptido de ALK3" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ALK3, así como también cualquier variante del mismo (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos ALK3 incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ALK3 conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de ALK3, y preferentemente al menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido de ALK3 puede unirse e inhibir la función de las BMP. Preferentemente, un polipéptido de ALK3 inhibe una actividad de GDF6.

Un polipéptido de ALK3 de unión a BMP es aquel que conserva la capacidad de unirse a las BMP, tal como a GDF6 (BMP13). Preferentemente, un polipéptido de ALK3 de unión a BMP se unirá a una BMP con una constante de disociación de 1 nM o menos. La secuencia de aminoácidos de la proteína precursora de ALK3 humana se proporciona en la SEQ ID NO:8 (el dominio extracelular es aa 24-152). El dominio extracelular de una proteína ALK3 se une a BMP y generalmente es soluble, y por lo tanto puede denominarse un polipéptido de ALK3 de unión a BMP soluble. Ejemplos adicionales de polipéptidos de ALK3 de unión a BMP solubles se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional WO2010114860. La secuencia del polipéptido de fusión ALK3(24-152)-Fc se muestra en la SEQ ID NO:9; las SEQ ID NO: 8 y 9 se muestran en la Tabla 1. La fusión ALK3(24-152)-Fc consiste en una fusión del dominio extracelular ALK3 de la ALK3 humana (residuos nativos 24-152) fusionada por el C-terminal con un dominio Fc humano a través de un enlazador de secuencia TGGG. Otros ejemplos de polipéptidos ALK3 de unión a BMP solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ALK3, por ejemplo, la secuencia líder de ALK3 nativa, el líder del activador de plasminógeno tisular (TPA) o el líder de melitina de abeja melífera. Los fragmentos funcionalmente activos de los polipéptidos de ALK3 pueden obtenerse mediante el tamizaje de polipéptidos producidos por vía recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido de ALK3. Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente mediante el uso de técnicas tales como la química f-Moc o t-Boc convencional Merrifield en fase sólida. Los fragmentos pueden producirse (por vía recombinante o por síntesis química) y analizarse para identificar aquellos fragmentos de péptido que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ALK3 o señalización mediada por las BMP, tal como GDF6.

Pueden disponerse diferentes elementos de las proteínas de fusión de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de ALK3 puede colocarse en el extremo C-terminal a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede colocarse en el extremo C-terminal a un polipéptido de ALK3. El dominio del polipéptido de ALK3 y el dominio heterólogo no necesitan ser adyacentes en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios adicionales o secuencias de aminoácidos en el dominio C- o N-terminal al dominio o entre los dominios.

Se observa que la fusión ALK3(24-152)-Fc recombinante cuando se produce mediante el uso de células CHO puede ser heterogénea ya que algunos aminoácidos codificados por la secuencia líder permanecen en el extremo N-terminal (por ejemplo, Ala y Gly) (ver la publicación de solicitud de patente internacional WO2010114860 para mas detalles).

Tabla 1 secuencias de fusión ALK3(24-152)-Fc																
SEQ ID NO: 8	Met	Pro	Gln	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Ile	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Tyr	Leu	Phe
	1				5					10					15	
	Ile	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Gly	Gln	Asn	Leu	Asp	Ser	Met	Leu	His	Gly
				20					25					30		
	Thr	Gly	Met	Lys	Ser	Asp	Ser	Asp	Gln	Lys	Lys	Ser	Glu	Asn	Gly	Val
			35					40					45			
	Thr	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Thr	Leu	Pro	Phe	Leu	Lys	Cys	Tyr	Cys	Ser
		50						55				60				
	Gly	His	Cys	Pro	Asp	Asp	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Cys	Ile	Thr	Asn	Gly
	65					70					75				80	
	His	Cys	Phe	Ala	Ile	Ile	Glu	Glu	Asp	Asp	Gln	Gly	Glu	Thr	Thr	Leu
					85					90					95	
	Ala	Ser	Gly	Cys	Met	Lys	Tyr	Glu	Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Cys	Lys	Asp
				100					105					110		
	Ser	Pro	Lys	Ala	Gln	Leu	Arg	Arg	Thr	Ile	Glu	Cys	Cys	Arg	Thr	Asn
			115					120					125			
	‘Leu	Cys	Asn	Gln	Tyr	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Val	Val	Ile	Gly

Tabla 1 secuencias de fusión ALK3(24-152)-Fc																
	130					135						140				
	Pro	Phe	Phe	Asp	Gly	Ser	Ile	Arg	Trp	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Ser	Met
	145					150						155				160
	Ala	Val	Cys	Ile	Ile	Ala	Met	Ile	Ile	Phe	Ser	Ser	Cys	Phe	Cys	Tyr
					165					170					175	
	Lys	His	Tyr	Cys	Lys	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Arg	Arg	Tyr	Asn	Arg	Asp
				180					185					190		
	Leu	Glu	Gln	Asp	Glu	Ala	Phe	Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp
			195					200					205			
	Leu	Ile	Asp	Gln	Ser	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Leu
	210					215						220				
	Leu	Val	Gln	Arg	Thr	Ile	Ala	Lys	Gln	Ile	Gln	Met	Val	Arg	Gln	Val
	225					230					235					240
	Gly	Lys	Gly	Arg	Tyr	Gly	Glu	Val	Trp	Met	Gly	Lys	Trp	Arg	Gly	Glu
				245					250						255	
	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Val	Phe	Phe	Thr	Thr	Glu	Glu	Ala	Ser	Trp	Phe
				260					265					270		
	Arg	Glu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gln	Thr	Val	Leu	Met	Arg	His	Glu	Asn	Ile

Tabla 1 secuencias de fusión ALK3(24-152)-Fc																
	275					280					285					
	Leu	Gly	Phe	Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Gly	Thr	Gly	Ser	Trp	Thr	Gln
	290					295					300					
	Leu	Tyr	Leu	Ile	Thr	Asp	Tyr	His	Glu	Asn	Gly	Ser	Leu	Tyr	Asp	Phe
	305					310					315					320
	Leu	Lys	Cys	Ala	Thr	Leu	Asp	Thr	Arg	Ala	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Tyr
	325					330					335					
	Ser	Ala	Ala	Cys	Gly	Leu	Cys	His	Leu	His	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gly	Thr
	340					345					350					
	Gln	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ala	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Ser	Lys	Asn	Ile
	355					360					365					
	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Gly	Ser	Cys	Cys	Ile	Ala	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala
	370					375					380					
	Val	Lys	Phe	Asn	Ser	Asp	Thr	Asn	Glu	Val	Asp	Val	Pro	Leu	Asn	Thr
	385					390					395					400
	Arg	Val	Gly	Thr	Lys	Arg	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	Val	Leu	Asp	Glu	Ser
	405					410					415					
	Leu	Asn	Lys	Asn	His	Phe	Gln	Pro	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Ile	Tyr	Ser

Tabla 1 secuencias de fusión ALK3(24-152)-Fc																
	420					425					430					
	Phe	Gly	Leu	Ile	Ile	Trp	Glu	Met	Ala	Arg	Arg	Cys	Ile	Thr	Gly	Gly
	435					440					445					
	Ile	Val	Glu	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Met	Val	Pro	Ser	Asp
	450					455					460					
	Pro	Ser	Tyr	Glu	Asp	Met	Arg	Glu	Val	Val	Cys	Val	Lys	Arg	Leu	Arg
	465					470					475					480
	Pro	Ile	Val	Ser	Asn	Arg	Trp	Asn	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Arg	Ala	Val
	485					490					495					
	Leu	Lys	Leu	Met	Ser	Glu	Cys	Trp	Ala	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Leu
	500					505					510					
	Thr	Ala	Leu	Arg	Ile	Lys	Lys	Thr	Leu	Ala	Lys	Met	Val	Glu	Ser	Gln
	515					520					525					
	Asp	Val	Lys	Ile												
	530															
SEQ ID NO:9	Gln	Asn	Leu	Asp	Ser	Met	Leu	His	Gly	Thr	Gly	Met	Lys	Ser	Asp	Ser
	1				5					10					15	
	Asp	Gln	Lys	Lys	Ser	Glu	Asn	Gly	Val	Thr	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Thr
	20					25					30					

Tabla 1 secuencias de fusión ALK3(24-152)-Fc																
	Leu	Pro	Phe	Leu	Lys	Cys	Tyr	Cys	Ser	Gly	His	Cys	Pro	Asp	Asp	Ala
			35					40					45			
	Ile	Asn	Asn	Thr	Cys	Ile	Thr	Asn	Gly	His	Cys	Phe	Ala	Ile	Ile	Glu
	50						55					60				
	Glu	Asp	Asp	Gln	Gly	Glu	Thr	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Cys	Met	Lys	Tyr
	65					70					75					80
	Glu	Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Cys	Lys	Asp	Ser	Pro	Lys	Ala	Gln	Leu	Arg
					85					90					95	
	Arg	Thr	Ile	Glu	Cys	Cys	Arg	Thr	Asn	Leu	Cys	Asn	Gln	Tyr	Leu	Gln
				100					105					110		
	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Val	Val	Ile	Gly	Pro	Phe	Phe	Asp	Gly	Ser	Ile
			115					120					125			
	Arg	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	130						135					140				
	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
	145					150					155					160
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
					165					170					175	

Tabla 1 secuencias de fusión ALK3(24-152)-Fc																
5	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
				180					185					190		
10	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
			195					200					205			
15	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
		210					215					220				
20	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
	225					230					235					240
25	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				245					250						255	
30	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			260						265					270		
35	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		275					280						285			
40	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		290					295				300					
45	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
	305				310						315					320
50	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				325					330					335		
55	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			340						345				350			
60	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
			355													

Otros agentes inhibidores que pueden usarse para inhibir específicamente la actividad de una proteína de la molécula relacionada con melanoma son compuestos químicos que inhiben directamente la actividad de la molécula relacionada con melanoma o inhiben la interacción entre las moléculas relacionadas con melanoma y las moléculas diana. Tales compuestos pueden identificarse mediante el uso de ensayos de tamizaje que seleccionan tales compuestos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: GDF6 se amplifica de forma recurrente en melanomas humanos y de pez cebra

Para estudiar el melanoma se ha usado el pez cebra, *Danio rerio* porque los estudios genéticos pueden realizarse rápidamente y un modelo de melanoma que se desarrolló en el pez cebra imita de cerca los tumores que se observan en

seres humanos. Los melanomas humanos tienen genomas complejos, y es difícil determinar cuál de los cambios genéticos presentes en un tumor contribuyó a la aparición del tumor y qué cambios genéticos se produjeron de manera incidental y no tuvieron impacto en la progresión del tumor. Con el objetivo de identificar nuevos genes de melanoma, se compararon los genomas de los melanomas de pez cebra con los de los melanomas humanos. Es probable que los cambios compartidos por los tumores en ambas especies sean importantes, y se usó este enfoque para derivar una breve lista de oncogenes candidatos. GDF6 estaba en esta lista corta porque se amplifica recurrentemente en melanomas de ambas especies - la mayoría de los melanomas de pez cebra tienen copias en exceso de la región del cromosoma 19 que contiene el gen *gdf6b* (el ortólogo de *GDF6* de pez cebra); en melanomas humanos, el intervalo que contiene *GDF6* se amplifica con frecuencia. Específicamente, copias adicionales de *GDF6* están presentes en melanomas humanos y copias adicionales de un *gdf6b* de pez cebra están presentes en los melanomas del pez cebra. Ver los ejemplos 17 y 18 para detalles adicionales.

Ejemplo 2: El ARNm de GDF6 y *gdf6b* es mayor en los tumores que las células y tejidos normales

Los intervalos amplificados de forma recurrente se enriquecen para los oncogenes, y estos oncogenes típicamente actúan a través de la sobreexpresión de su ARNm y productos proteicos. Se analizó la expresión de ARNm de *GDF6* tanto en melanomas humanos como de pez cebra y se encontró que su expresión en tumores es mayor que en los melanocitos normales (Figuras 1, 2). Además, se tiñeron tejidos humanos con anticuerpos que reconocen la proteína GDF6 y se descubrió que la proteína GDF6 está presente en los melanomas pero ausente de los melanocitos normales. Se observaron hallazgos similares en el pez cebra mediante el uso de anticuerpos que reconocen específicamente la proteína *gdf6b* del pez cebra. Estos hallazgos son consistentes con la posibilidad de que *GDF6* podría actuar como un oncogén a través de la sobreexpresión de su producto génico normal durante el proceso de iniciación y progresión del tumor. Ver los Ejemplos 18 y 19 para detalles adicionales.

Ejemplo 3: La SMAD1/5/8 fosforilada está presente en melanomas pero no en melanocitos normales

GDF6 es un miembro de la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP). Los factores de BMP son proteínas secretadas que típicamente actúan uniéndose a los receptores de BMP y señalizando a través de factores de transcripción SMAD1/5/8. Para determinar si los melanomas tenían señalización activa a través de esta vía, se tiñeron tejidos humanos mediante el uso de un anticuerpo que es específico para la variante activada y fosforilada de SMAD 1/5/8. Al igual que con la proteína GDF6, el SMAD fosforilado 1/5/8 estaba presente en los melanomas pero no en los melanocitos normales. Ver el Ejemplo 19 para detalles adicionales.

Ejemplo 4: Los melanomas surgen rápidamente en un modelo de pez cebra cuando *gdf6b* se expresa en melanocitos

Se usaron estudios en cultivo de tejido de pez cebra y humano, así como también en xenotrasplante para determinar que GDF6 afecta la progresión del melanoma. Para probar el efecto de un gen sobre la progresión del melanoma en el pez cebra, se usó un sistema en el que se reconstituyeron los melanocitos en una cepa propensa al melanoma y se cuestionó si un gen expresado en estos melanocitos reconstituidos afecta la aparición del melanoma. Cuando *gdf6b* se expresó en este sistema, los melanomas surgieron más rápidamente (Figura 3), lo que indica que es un oncogén que acelera la progresión del melanoma. Ver el Ejemplo 20 para detalles adicionales.

Ejemplo 5: GDF6 parece actuar a través de SMAD1/5/8 y otros componentes de la vía de señalización BMP para permitir la supervivencia de las células de melanoma

Se usaron células de melanoma humano cultivadas para estudiar los efectos de atenuar *GDF6*. Mediante el uso de los ARNsh independientes y múltiples para lograr la atenuación, se encontró que la reducción de *GDF6* en las líneas celulares de melanoma provocó una reducción en la proliferación (Figuras 4A-D) que se produjo por inducción de apoptosis o muerte celular programada (Figura 6A-B). La atenuación de SMAD1/5/8 provocó defectos similares (Figuras 5A-D; Figura 7), y en un enfoque ortogonal, se usó un inhibidor de molécula pequeña para anular la actividad de señalización de BMP, y también se observaron defectos de crecimiento (Figura 8A-C). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que GDF6 actúa a través de SMAD1/5/8 y otros componentes de la vía de señalización BMP para permitir la supervivencia de las células de melanoma. Ver el Ejemplo 22 para detalles adicionales.

Ejemplo 6: La atenuación de GDF6 reduce el crecimiento de melanoma in vivo

Un modelo aceptado en la técnica para evaluar los efectos de un agente sobre el melanoma es el que usa ratones inmunocomprometidos ("desnudos") que después se inyectan por vía subcutánea con células de melanoma, y después concomitante con la inyección de las células, en algún momento después de la inyección, y/o después En el establecimiento del tumor, el agente de prueba se administra adecuadamente (por ejemplo, por vía intravenosa, peritoneal, oral, etc.). Los animales de control y tratados son monitoreados en parte por el crecimiento tumoral, la estabilización tumoral y la regresión tumoral (ver, por ejemplo, Yang y otros 2010. Cancer Res., 70:5518-5527 y Bollag y otros 2010. Nature. 467:596-599).

Para determinar si la atenuación de GDF6 afecta la capacidad de iniciación tumoral de las células de melanoma cultivadas, se atenuó GDF6 en células de melanoma A375 y se xenotrasplantaron estas células a ratones desnudos (Figura 9). Como

se esperaba, la atenuación de GDF6 provocó un inicio tumoral deteriorado en comparación con la atenuación de un gen de control. GDF6 codifica una proproteína que se escinde para generar GDF6 maduro, que es secretado por la célula. Ver el Ejemplo 20 para detalles adicionales.

5 Ejemplo 7: Después de la atenuación de GDF6, la proliferación de las células de melanoma puede restaurarse mediante la suplementación con proteína GDF6 recombinante

10 Para determinar si el GDF6 secretado puede facilitar el crecimiento de las células de melanoma, se atenuó GDF6 mediante el uso de ARNsh y después se trataron estas células con la proteína GDF6 recombinante (Figura 10). Las células atenuadas tratadas con GDF6 recombinante pudieron mantener su proliferación, lo que sugiere que la forma extracelular secretada de GDF6 es un ligando importante para la supervivencia de las células de melanoma.

15 Ejemplo 8: Resumen de los ejemplos y atenuación de GDF6 en células que expresan una variante SMAD1 constitutivamente activa

20 Las regiones de variación recurrente del número de copias de genes (CNV) contienen genes que afectan la progresión tumoral. Para identificar estos genes se definieron regiones de CNV recurrente en melanomas de pez cebra y se compararon estas regiones con las alteradas de forma recurrente en melanomas humanos. En el conjunto de genes que se amplificaron de forma recurrente en ambas especies, se encontró el factor GDF6 de BMP (Ejemplo 1). Debido a que se encontró que la señalización de BMP estaba regulada positivamente en melanomas, se investigó el papel de GDF6 en la progresión del melanoma. En los análisis tanto de pez cebra como de humanos, el ARNm y la proteína GDF6 se regularon positivamente en melanomas en comparación con los melanocitos normales (Ejemplo 2). En las evaluaciones funcionales, se encontró que la sobreexpresión de GDF6 aceleró el inicio del melanoma en el pez cebra (Ejemplo 4). Además, la atenuación de GDF6 en líneas celulares de melanoma condujo a la muerte celular apoptótica en cultivo in vitro y en xenotrasplantes de ratones in vivo (Ejemplos 5, 6). La adición de proteína GDF6 recombinante a los medios rescató a las células de melanoma de sufrir apoptosis inducida por ARNsh de GDF6, lo que sugiere que GDF6 actúa como un factor secretor para ayudar a la supervivencia de las células de melanoma (Ejemplo 4). Se predice que GDF6, como otros factores de BMP, señala a través de factores de transcripción SMAD1/5/8, y se observaron defectos de crecimiento similares cuando se atenuó SMAD1 en células de melanoma (Ejemplo 5).

30 Para definir mejor la relación entre GDF6 y SMAD1 en el melanoma, se realizó la atenuación de GDF6 en células que expresaban una variante SMAD1 constitutivamente activa. Esta variante rescató la muerte provocada por la atenuación de GDF6, lo que sugiere que, al menos en parte, GDF6 actúa a través de SMAD1 para promover la supervivencia de las células de melanoma. Estos datos establecen un papel para la señalización de BMP en el melanoma e identifican un factor secretor novedoso, GDF6, que media en este papel. GDF6 es un excelente objetivo terapéutico debido a su naturaleza secretora y su expresión en la mayoría de los melanomas humanos.

Ejemplo 9: La sobreexpresión de GDF6 acelera la formación de melanoma en xenoinjertos de ratón

40 Las células de melanoma se transfectaron con un vector Lenti CMV o un vector Lenti CMV que contenía el constructo de *GDF6*. La expresión de la proteína *GDF6* se reguló positivamente en esas células que reciben el constructo de *GDF6*, pero no en aquellas células que reciben el vector vacío (Figura 12A). Cuando las células se trasplantaron a ratones, los volúmenes tumorales aumentaron rápidamente con el tiempo en células que sobreexpresaban *GDF6*, mientras que los volúmenes tumorales para células transfectadas con vector vacío aumentaron mucho más lentamente (Figura 12B). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *GDF6* acelera la formación de melanoma en xenoinjertos de ratón. Ver el Ejemplo 20 para detalles adicionales.

Ejemplo 10: La sobreexpresión de GDF6 reduce los niveles basales de muerte celular del dell en xenoinjertos de ratón

50 Las células trasplantadas del Ejemplo 9 se examinaron p'ara determinar marcadores de muerte celular. Cuando el tejido de células que contienen xenoinjertos sobreexpresan *GDF6* se someten a tinción TUNEL, solo se tiñó aproximadamente el 1 % de las células; por el contrario, cuando las células de control (células transfectadas con vector vacío) se tiñeron de manera similar, un poco más del 3 % de las células mostraron tinción TUNEL (Figura 13A). Se observaron resultados similares cuando las células se tiñeron con otro marcador de muerte celular, caspasa 3 escindida, en donde la muerte celular se reduce a la mitad en células que sobreexpresan *GDF6* en comparación con los controles (1 % *GDF6* frente a aproximadamente el 2 % de control; Figura 13B). Se observó que los melanomas de sobreexpresión del ortólogo de GDF6 se correlacionan negativamente con una firma proapoptótica (Figura 13C). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *GDF6* reduce los niveles basales de muerte celular en xenoinjertos de ratón. Ver el Ejemplo 21 para detalles adicionales.

60 Ejemplo 11: La atenuación de GDF6 o SMAD1 anula el crecimiento de melanoma en xenoinjertos de ratón in vivo

65 Las células de melanoma se trataron con ARNsh, incluidos dos dirigidos a *GDF6*, shGDF6#1 y shGDF6#2, y un ARNsh de control, shGFP. Cuando se examinó la expresión de proteínas *GDF6* en células tratadas con ARNsh, se observó que shGDF6#1 inhibía parcialmente la expresión de proteínas *GDF6* mientras que shGDF6#2 fue más eficaz que shGDF6#1 en comparación con los controles tratados con shGFP (Figura 14A). Cuando estas células se trasplantan a ratones, las

células tratadas con shGDF6#2 muestran muy poca formación de tumor como se midió por el volumen tumoral, mientras que las células tratadas con shGDF6#1 muestran tumores intermedios entre las células tratadas con control (shEGFP) y las células tratadas con shGDF6#2- (Figura 14B). Se observaron resultados similares para las células tratadas con ARNsh que se dirige a *SMAD1*. La expresión de proteínas *SMAD1* disminuyó significativamente para las células tratadas con shSMAD1#1 y shSMAD1#2 en comparación con las células tratadas con control (tratadas con shGFP; Figura 14C). Cuando se trasplantaron en ratones, las células de control formaron tumores con el tiempo como se midió por el volumen tumoral, mientras que las células tratadas con shSMAD1#1 formaron solo tumores muy pequeños durante el mismo período de tiempo (Figura 14D). Ver los ejemplos 20 y 22 para detalles adicionales.

10 Ejemplo 12: La atenuación de GDF6 induce la muerte celular en xenoinjertos de ratón in vivo

Cuando se observó el tejido de xenoinjerto celular trasplantado del Ejemplo 11 para la tinción TUNEL, solo aproximadamente el 2,5 % de las células de control (tratadas con shGFP) mostraron tinción, mientras que aproximadamente el 10 % de las células con GDF6 atenuado se tiñeron (Figura 15A). Se obtuvieron resultados similares para la tinción de otro marcador de muerte celular, caspasa 3 escindida. La tinción de las células de control (shGFP) se observó en aproximadamente el 2 %, mientras que aproximadamente el 7 % de las células con *GDF6* atenuado se tiñeron. Estos resultados sugieren que la atenuación de *GDF6* induce la muerte celular en xenoinjertos de ratón *in vivo*. Ver el Ejemplo 21 para detalles adicionales.

20 Ejemplo 13: El fosfomimético de SMAD1 puede rescatar el potencial clonogénico de las células de melanoma después de la atenuación de GDF6 in vitro e in vivo

Las células de melanoma se transfectaron con un vector que comprende un SMAD1DVD etiquetado con FLAG, que codifica una variante SMAD1 que es un fosfomimético de SMAD1 o el mismo vector sin el constructo de SMAD1DVD. El análisis de la expresión de proteínas mostró una buena expresión de la proteína SMAD1DVD (como se detectó por el epítipo FLAG), mientras que las células de control transfectadas con vector vacío no mostraron tinción (Figura 16A). A continuación, estas células se trataron con una serie de ARNsh, incluido el ARNsh de control (shGFP) y los ARNsh que se dirigen a *GDF6*. Las células tratadas con ARNsh se sometieron después a un ensayo de crecimiento clonogénico. Cuando se atenuó *GDF6* en células transfectadas con el vector vacío, se formaron pocas colonias en comparación con el control (células vacías transfectadas con vector tratadas con shGFP; Figura 16B). Cuando las células que expresan el fosfomimético de SMAD1 se trataron con los ARNsh que se dirigen a *GDF6* (shGDF6#1 y shGDF6#2) y se sometieron al mismo ensayo de crecimiento clonogénico, la capacidad de formar colonias se restauró parcialmente (Figura 16B). Cuando estas células se trasplantaron a ratones para producir xenoinjertos, las células de control de vector vacío y las células que expresan el fosfomimético de *SMAD1*, ambas tratadas con el ARNsh de control, shGFP, formaron tumores con el tiempo (Figura 16C). Sin embargo, cuando las células con fosfomimético de *SMAD1* tienen *GDF6* atenuado ya sea con shGDF6#1 o shGDF6#2, la formación de tumores se aceleró después del día 15 (Figura 16D). Sin embargo, en células que no expresaron el fosfomimético (células transfectadas con vector vacío) y con atenuación de la expresión de *GDF6* ya sea con shGDF6#1 o shGDF6#2, solo se formaron tumores pequeños (Figura 16D). Estos resultados sugieren que el fosfomimético de *SMAD1* puede rescatar el potencial clonogénico de las células de melanoma después de la atenuación de *GDF6 in vitro*. Ver el Ejemplo 22 para detalles adicionales.

Ejemplo 14: Un inhibidor de molécula pequeña de la vía BMP, DMH1, anula el crecimiento de melanoma en xenoinjertos de ratón in vivo

Los xenoinjertos de melanoma de ratón se trataron con un inhibidor de molécula pequeña (DMH1) de la vía BMP o solo con vehículo. En las células tratadas con DMH1, surgieron tumores más pequeños y crecieron más lentamente como se midió por el volumen tumoral que aquellos tratados solo con vehículo (Figura 17). Ver el Ejemplo 22 para detalles adicionales.

50 Ejemplo 15: La expresión de GDF6 se correlaciona con la pobre supervivencia del paciente con melanoma

La supervivencia de los sujetos que padecen de tumores de baja expresión de *GDF6* y de tumores de alta expresión de *GDF6* se representaron en el tiempo; la Figura 18 muestra los resultados. Con el tiempo, menos de los que padecen de tumores de expresión de *GDF6* los sobrevivieron en comparación con los que padecen de tumores de baja expresión de *GDF6*. Estas observaciones sugieren que la expresión de *GDF6* se correlaciona con una pobre supervivencia del paciente con melanoma. Ver el Ejemplo 24 para detalles adicionales.

Ejemplo 16: Efecto de la fusión de la quinasa 3 similar a receptor de activina (ALK3)-Fc sobre las células de melanoma

ALK3 se une a GDF6 (Mazerbourg y otros 2005. J Biol Chem 280:32122-0320 y potencialmente puede atrapar el ligando GDF6 in vivo. Para estos experimentos, se usará una fusión ALK3-Fc; esta fusión es entre un dominio Fc de inmunoglobulina humana y el dominio extracelular de ALK3 humano (ver la publicación de solicitud de patente internacional WO2010114860 para detalles adicionales).

En un primer experimento, se añadirá ALK3-Fc a las células de melanoma cultivadas y se monitorearán las medidas de viabilidad celular para comprender si ALK3-Fc puede recapitular el efecto de la atenuación de GDF6.

Las células de melanoma se mantendrán en cultivo mediante el uso de métodos estándar ya sea en medio DMEM+FBS. Se añadirá ALK3-Fc a los medios de cultivo (a 0,5-1 µg/ml de medios) y se determinarán las medidas de crecimiento y viabilidad celular. Estas medidas incluirán el recuento celular, la viabilidad celular evaluada mediante el uso de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y la evaluación de la formación de colonias. Inicialmente se tratarán dos líneas de células de melanoma A375. Una línea se transfecta de manera estable con un constructo vectorial; se anticipa que esta línea celular será sensible a la inhibición de GDF6 mediada por ALK3-Fc. Otra línea se transfecta de manera estable con un constructo de SMAD1-DVD; se anticipa que esta línea celular será resistente a la inhibición mediada por ALK3-Fc porque SMAD1-DVD activa en exceso la señalización de BMP corriente abajo del bloque ALK3-Fc. En experimentos anteriores, las células A375+vector eran sensibles a la inhibición del shARN de GDF6, mientras que las células A375+SMAD1-DVD eran resistentes. El uso de ambas líneas celulares es importante para establecer la especificidad del tratamiento con ALK3-Fc; es decir, es importante establecer que ALK3-Fc no es generalmente citotóxico.

En un segundo experimento, se establecerán melanomas en ratones inmunocomprometidos. A los ratones con tumores (ver el Ejemplo 6 para la descripción del modelo de ratón) se les inyectará ALK3-Fc y se medirá la regresión tumoral. Los experimentos iniciales tratarán ratones con tumores sembrados por líneas celulares de melanoma establecidas para que pueda determinarse el efecto y la dosificación del fármaco. Los experimentos secundarios tratarán ratones con tumores derivados de tumores de pacientes. Tales experimentos se usarán para determinar si ALK3-Fc tiene eficacia contra una población de células tumorales heterogéneas que no ha sido alterada por las condiciones de cultivo.

En los experimentos iniciales en esta fase, los ratones desnudos se inyectarán con células A375+vector o células A375+SMAD1-DVD y después se tratarán con ALK3-Fc (inyección intraperitoneal de 2 mg/kg cada dos días). Como se describió anteriormente para la fase *in vitro*, se anticipa que los tumores derivados de células A375+vector serán sensibles a ALK3-Fc, mientras que los tumores derivados de A375+SMAD1-DVD serán resistentes. Estos experimentos se realizarán en primer lugar con el tratamiento con ALK3-Fc comenzando simultáneamente con la inoculación de células tumorales. En segundo lugar, se realizarán experimentos de regresión en los que el tratamiento con ALK3-Fc comienza después de la inoculación, cuando ya se han establecido tumores pequeños palpables. Los experimentos posteriores se realizarán mediante el uso de xenoinjertos derivados de pacientes establecidos en ratones inmunodeficientes NSG. Se realizarán regímenes de tratamiento similares a los anteriores en los que el tratamiento en un grupo comenzará simultáneamente con la inoculación, y el tratamiento en otro grupo comenzará solo cuando se hayan establecido tumores palpables. Juntos, estos estudios obtendrán medidas preclínicas útiles de eficacia de ALK3-Fc.

Ejemplo 17: Análisis genómico comparativo de genes que se amplifican de forma recurrentemente en melanomas humanos

Se presume que un enfoque comparativo entre especies con el pez cebra ayudaría en la identificación de genes de cáncer en regiones de CNV amplias. Los seres humanos y el pez cebra están separados por 420 millones de años, y se predice que la reorganización genómica que se ha producido con el tiempo coloca con frecuencia genes impulsores ortólogos junto a diferentes genes vecinos en cada especie. En consecuencia, los genes conductores ortólogos se alterarían en ambas especies, pero los cambios en los genes de pasajeros vecinos se limitarían a una sola especie. Para probar esta hipótesis, se buscó comparar genes que se amplifican recurrentemente en melanomas humanos, aproximadamente el 10 % del genoma, con genes amplificados recurrentemente en melanomas de pez cebra. Mediante el uso de melanomas que surgieron autóctonamente en una cepa de pez cebra *Tg(mitfa:BRAFV600E); p53(lf)* (E. E. Patton y otros, *BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma*. *Current biology* : CB 15, 249-254 (2005)), se realizó la hibridación genómica comparativa de matriz (aCGH) para generar perfiles de CNV (Figura 19A). Los valores de aCGH se analizaron con el algoritmo JISTIC (F. Sanchez-Garcia, U. D. Akavia, E. Mozes, D. Pe'er, JISTIC: identification of significant targets in cancer. *BMC bioinformatics* 11, 189 (2010)) para definir intervalos recurrentes variados, que se superponen en gran medida con los intervalos obtenidos en estudios independientes de melanomas de pez cebra. Los genes amplificados recurrentemente a partir de intervalos JISTIC se compararon con sus ortólogos humanos. El grado de superposición entre los ortólogos amplificados en ambas especies es mayor de lo esperado por casualidad (Figura 19B), lo que sugiere que la amplificación de genes conductores similares subyace mecánicamente a la formación de tumores en ambas especies. Como indicación adicional de la conservación mecánica, los conductores de melanoma conocidos se amplificaron de forma recurrente en ambas especies, incluyendo *TERT*, *MYC* y *SETDB1*.

Ejemplo 18: Análisis de expresión comparativo de genes que se amplifican de forma recurrente en melanomas humanos

Los análisis de expresión se usaron para separar aún más la lista de candidatos. Dado que los genes conductores amplificados por el número de copias actúan predominantemente por regulación positiva de los transcritos de tipo silvestre, se obtuvieron perfiles transcripcionales de melanomas de pez cebra y melanocitos normales. Genes amplificados de forma recurrente en ambas especies y regulados de forma positiva transcripcionalmente en el pez cebra incluido *gdf6b* (Figuras 19C, 19H y 19I), un ortólogo del factor *GDF6* BMP (a.k.a. *BMP13*). Los genes humanos frecuentemente tienen dos ortólogos de pez cebra debido a una duplicación parcial del genoma en el linaje de teleosteos. El segundo ortólogo de pez cebra de *GDF6* humano, *gdf6a*, no se amplificó de forma recurrente, pero se encontraba entre los genes con mayor regulación positiva transcripcional en melanomas en comparación con los melanocitos (Figuras 19C y 19I).

Ejemplo 19: GDF6 se amplifica y, junto con la señalización de BMP, se regula positivamente en melanomas

Codificando ligandos de BMP, se predice que los genes *GDF6* actuarán a través de factores de transcripción *SMAD1/5/8*. Mediante el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente las proteínas *SMAD1/5/8* fosforiladas para monitorear la actividad de la vía BMP, se encontró una tinción nuclear de fosfo-*SMAD 1/5/8* robusta en melanomas de pez cebra (Figura 19D). Además, los análisis de transcriptoma indicaron una regulación positiva robusta en melanomas de genes que admiten la señalización de BMP, incluida las subunidades de receptor *BMPR1A* y *BMPR2*, a través de las cuales se sabe que *GDF6* actúa (Figura 19E). Los análisis de transcriptoma también indicaron que los ortólogos de *GDF6* fueron los únicos ligandos BMP regulados positivamente en los melanomas de pez cebra (Figura 19F). Además, la inmunotinción con anticuerpos específicos para ortólogos de pez cebra *GDF6* mostró expresión de proteínas *GDF6* específicamente en melanomas (Figuras 19D y 19G). Tomados en conjunto, estos datos indican que la vía de BMP está activa en los melanomas de pez cebra y que los ortólogos de *GDF6* pueden ser críticos en esta activación.

Ejemplo 20: La modulación de *GDF6* afecta el crecimiento y la supervivencia de las células de melanoma

Después se evaluó cómo una ganancia o pérdida de *GDF6* afecta la progresión del melanoma. En pez cebra, se elevó la expresión de *gdf6b* en melanocitos en un fondo de *Tg(mitfa:BRAFV600E);p53(lf)* mediante el uso del sistema miniCoopR, como se describió anteriormente (C. J. Ceol y otros, The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. Nature 471, 513-517 (2011)). En el pez con melanocitos que sobreexpresaban *gdf6b* se había acelerado el inicio del melanoma (inicio medio = 13 semanas) en comparación con los controles que expresaban *EGFP* (inicio medio = 17 semanas) (Figuras 3 y 20A). En las células de melanoma humano A375, que son mutantes para *BRAFV600E*, la sobreexpresión de *GDF6* dio como resultado un mejor crecimiento independiente del anclaje en los ensayos de agar blando (Figuras 12A, 20B y 20C), aunque no hubo una diferencia marcada en la tasa de proliferación (Figura 21A) o el crecimiento dependiente de anclaje (Figura 21B) en comparación con células de control. Cuando se trasplanta en ratones inmunocomprometidos, las células que sobreexpresan *GDF6* muestran un potencial tumorigénico elevado (Figuras 12B y 20D). Para determinar los efectos de la pérdida de *GDF6*, se atenuó *GDF6* en células A375 mediante el uso de múltiples ARNsh independientes (Figuras 14A y 20E). La atenuación de *GDF6* condujo a una desventaja de crecimiento *in vitro* (Figuras 20F y 21C) y provocó una reducción pronunciada en el potencial tumorigénico en xenoinjertos de ratón en comparación con un control con *EGFP* atenuado (Figuras 14B y 20G). En conjunto, estos datos indican que *GDF6* actúa como un oncogén a través de la expresión elevada y su atenuación conduce a una anulación del potencial tumorigénico.

Ejemplo 21: Efectos de la modulación de *GDF6* sobre el crecimiento y la supervivencia de las células de melanoma A375

Se investigó más a fondo las consecuencias de la modulación de *GDF6*. Para comenzar, se realizó una secuenciación de ARN paralela masiva (RNA-seq) en células A375 que expresan *GDF6* en comparación con los controles de vector vacío. El análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) reveló que la expresión de *GDF6* se correlacionó negativamente con la expresión de los genes de la vía apoptótica (Figura 20H). Debido a que la expresión elevada de *GDF6* estaba vinculada a la regulación negativa de los genes apoptóticos, se planteó la hipótesis de que la atenuación de *GDF6* provocaría una regulación negativa de los genes apoptóticos, lo que conduciría a la muerte de las células de melanoma. De hecho, el ARN-seq de las células con *GDF6* atenuado mostraron regulación positiva del mismo conjunto de genes apoptóticos (Figura 21D). Al medir directamente la apoptosis en células de melanoma A375 con atenuación de *GDF6*, se encontró un aumento en los niveles de AnnexinV (Figura 21E) y en la actividad de Caspasa 3/7 (Figura 20I). Las líneas celulares de melanoma SK-MEL-28 (*BRAFV600E*-mutante) y MeWo (*BRAF* tipo silvestre) también aumentaron la muerte celular y mostraron defectos de crecimiento *in vitro* tras la atenuación de *GDF6* (Figuras 22A-22E). *In vivo*, la tinción de xenoinjertos de ratones A375 mostró un aumento de la positividad a TUNEL (Figura 20J) y a caspasa3 escindida (Figura 21F) en tumores con *GDF6* atenuado en comparación con los controles. Por el contrario, los xenoinjertos de ratón con sobreexpresión de *GDF6* mostraron tinción reducida con TUNEL (Figuras 13A y 20K) y con caspasa3 escindida (Figuras 13B y 21G) en comparación con los niveles basales de muerte celular en xenoinjertos de control. Los xenoinjertos de sobreexpresión de *GDF6* tuvieron un índice proliferativo Ki67 ligeramente aumentado, lo que sugiere que la reducción de la muerte celular no fue provocada por un acoplamiento obligatorio de la muerte celular a la proliferación celular (Figura 21H). La participación de *GDF6* en la muerte celular es consistente con los hallazgos en los cuales la pérdida de ortólogos de *GDF6* en peces y *Xenopus* provoca un aumento significativo en la apoptosis durante el desarrollo ocular y neuronal. En suma, *GDF6* es un factor de supervivencia esencial para las células de melanoma, y su pérdida conduce a la muerte celular apoptótica.

Ejemplo 22: La modulación *GDF6* y *SMAD1* altera la expresión de los objetivos *ID1* e *ID3* de la ruta de BMP

La fuerte tinción con fosfo-*SMAD 1/5/8* en melanomas de pez cebra sugirió que *GDF6*, como otros ligandos BMP, actúa a través de la cascada de señalización de *SMAD 1/5/8*. Para probar más directamente esta posibilidad, se moduló la actividad de la vía en las células de melanoma A375. La atenuación de *GDF6* en las células A375 condujo a una disminución en los niveles de fosfo-*SMAD 1/5/8* (Figura 23A), así como también a la reducción de los transcritos de *ID1* y *ID3* (Figura 24), genes que son dianas de la señalización de BMP y son directamente regulados por proteínas *SMAD*. La atenuación de *SMAD1* condujo a defectos en el crecimiento celular y el potencial tumorigénico, así como también a un aumento de la muerte celular (Figuras 14D, 23B y Figura 25); similar a lo observado en células con *GDF6* atenuado. La inhibición de la señalización de BMP con la molécula pequeña DMH1 condujo de manera similar a una disminución de la tumorigenicidad (Figuras 17 y 23C). Para probar la relación de *GDF6* con respecto a *SMAD1* en los análisis de epistasia, se expresó una variante fosfomimética de *SMAD1*, *SMAD1DVD*, en células A375 (Figura 26A). Mientras que el crecimiento

de células A375 y el potencial tumorigénico fueron anulados por la atenuación de *GDF6*, se rescataron las células A375 que expresan *SMAD1DVD*, exhibiendo un crecimiento robusto ensayos de formación de colonias (Figura 26B) y de xenotrasplante (Figuras 16C y 23D). Adicionalmente, *SMAD1DVD* también revirtió la inducción apoptótica y la reducción de la expresión génica de *ID1* y *ID3* provocada por la atenuación de *GDF6* (Figuras 15B, 23E, 23F, 24, 26C y 26D). Los defectos en el crecimiento provocados por el tratamiento con DMH1 también fueron revertidos por *SMAD1DVD* (Figura 27). Estos datos indican que *GDF6* actúa, al menos en parte, a través de *SMAD1*, y por extensión el eje *SMAD1/5/8*, en la promoción de la supervivencia celular del melanoma.

Ejemplo 23: *GDF6* actúa a través de *SMAD1* para promover la supervivencia de las células de melanoma y modular la expresión de genes de la cresta neural

Para investigar aún más el efecto de *GDF6* y la señalización de BMP en los melanomas, se compararon los transcriptomas de células A375 en las que se moduló la actividad de *GDF6* o *SMAD1*. Se definió el conjunto de genes que estaba regulado de manera diferencial tras la atenuación de *GDF6* y mostró regulación diferencial recíproca en células que expresan *SMAD1DVD* que se sometieron a atenuación de *GDF6* (Figura 23G). El análisis de la vía demostró que este conjunto de genes se superponía de manera más significativa con los genes que definen la osificación y las vías de la cresta neural. Curiosamente, se incluyeron entre los genes regulados recíprocamente encontrados en la vía de la cresta neural estaban *FOXD3*, *SNAI2*, *SOX10* y otros que se conoce que promueven la supervivencia de las células de la cresta neural y sus derivados (Figuras 23H y Figura 28). Estos genes de prosupervivencia se regularon negativamente tras la atenuación de *GDF6* pero se regularon positivamente de forma recíproca en células que expresan *SMAD1DVD* con atenuación de *GDF6*. Los melanocitos se desarrollan inicialmente en la cresta neural, y un conjunto de genes que promueven la proliferación y migración de las células de la cresta neural se desactivan en los melanocitos tras la diferenciación terminal. Sin embargo, los melanomas expresan algunos de estos genes de cresta neural, y la adopción de una identidad similar a la cresta neural puede contribuir a la naturaleza agresiva de las células de melanoma. Durante el desarrollo *GDF6* y sus ortólogos son reguladores de las células de la cresta neural y sus derivados, y la pérdida de *GDF6* está relacionado con la muerte de los tejidos derivados de la cresta neural. Se especuló que *GDF6* promueve una identidad de cresta neural de las células de melanoma, invocando mecanismos de prosupervivencia que normalmente funcionan en la cresta neural embrionaria.

Ejemplo 24: Expresión de *GDF6* e importancia pronóstica en melanomas derivados del paciente

A continuación se evaluó la expresión de *GDF6* en melanomas humanos y se examinaron posibles implicaciones clínicas. A partir de un análisis de Cancer Genome Atlas y otros conjuntos de datos disponibles públicamente, los transcritos de *GDF6* estuvieron ampliamente presentes en muestras de pacientes con melanoma humano, pero estuvieron casi ausentes en los melanocitos normales (Figura 29A). En apoyo del hallazgo de que *GDF6* es un gen de prosupervivencia, GSEA mediante el uso de muestras de melanoma humano demostró que la firma del gen apoptótico descrita anteriormente una vez más se correlacionó negativamente con la expresión de *GDF6* (Figura 29B). La inmunohistoquímica en muestras de pacientes con melanoma detectó altos niveles de proteína *GDF6* en melanomas; sin embargo, los melanocitos normales de piel adyacente (Figura 29C) o las células infiltrantes de tumores (Figura 30) rara vez expresaron *GDF6*. En las mismas muestras, se encontró una alta actividad de la vía de BMP, como se midió mediante la tinción con fosfo-*SMAD1/5/8*, en melanomas humanos pero poca o nula actividad de BMP en melanocitos de piel adyacente normal (Figura 29D). Para determinar si la expresión de *GDF6* se correlacionó con las características clínicas del paciente con melanoma, se realizó inmunohistoquímica en un micromatriz con 104 núcleos de tejido de melanoma del paciente (78 melanomas primarios y 26 melanomas metastásicos). De acuerdo con la cohorte inicial, se observó una expresión robusta de *GDF6* en la mayoría de los melanomas (80 % del total; n=104 casos) (Figura 29E). Es importante destacar que las curvas de Kaplan-Meier muestran que los pacientes con melanomas *GDF6* altos tenían probabilidades de supervivencia significativamente más bajas que los pacientes con melanomas *GDF6* bajos o nulos en el momento del diagnóstico (Figura 29E). Los experimentos descritos anteriormente muestran que *GDF6* promueve la progresión del melanoma, y estos datos de inmunohistoquímica indican que los tumores que expresan *GDF6* están asociados con un peor pronóstico y, por lo tanto, es probable que sean más agresivos.

Ejemplo 25: La atenuación de *GDF6* y *SMAD1DVD* altera la expresión de genes importantes para la supervivencia de las células de la cresta neural y sus derivados

En este estudio, la genómica comparativa e integradora identificó a *GDF6* como un gen que se amplifica de forma recurrente y se regula de forma transcripcional en melanomas. Los análisis funcionales señalan su papel, así como también el de la señalización de la vía de BMP, en la promoción de la supervivencia de las células de melanoma. Durante el desarrollo embrionario, *GDF6* y sus ortólogos se expresan en la cresta neural, el tubo neural adyacente y el cartílago derivado de la cresta neural y los precursores de células retinianas. La pérdida de los ortólogos de *GDF6* en ratones, *Xenopus* y pez cebra conducen a anomalías esqueléticas y oculares, la última de las cuales es provocada por la muerte inapropiada de las células precursoras de la retina. Estos estudios son consistentes con la noción de que *GDF6* normalmente funciona para proteger a los progenitores tisulares de la muerte celular, y su regulación positiva, mediante amplificación cromosómica u otro medio, en melanomas y otros tumores previene la muerte celular, lo que facilita de este modo el crecimiento tumoral (Figura 29F). Los estudios de atenuación indican que la inhibición de *GDF6* ralentiza el crecimiento tumoral. Como molécula secretada, la inhibición de *GDF6* podría lograrse *in vivo* mediante una variedad de medios, incluidas las terapias impermeables a las células. Si bien se han logrado grandes avances en el tratamiento del

melanoma mediante el uso de terapias dirigidas e inhibidores del punto de control inmunitario, la mayoría de los pacientes con enfermedad avanzada aún sucumben dentro de los cinco años posteriores al diagnóstico. Dianas tales como el GDF6 representan excelentes oportunidades terapéuticas para tratar aún más esta enfermedad letal.

5 Ejemplo 26: Materiales y métodos

Líneas celulares y cultivo celular

10 Las células A375, MeWo y HEK293T (ATCC) se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y las células SK-MEL-28 (ATCC) se mantuvieron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) y 2 ug/ml de Pen Strep (Gibco) a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células cultivadas al mismo tiempo se agruparon, contaron y después se sembraron en un plato de 10 cm. Los pocillos/placas se sometieron a tratamiento con vectores lentivirales.

15 Infección lentiviral

Las infecciones lentivirales se realizaron como se describió anteriormente (C. J. Ceol y otros, The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. (Nature 471, 513-517 (2011)). Para atenuaciones de genes estables, se usaron vectores lentivirales pLKO-1 para suministrar secuencias de horquilla corta (ARNsh) (obtenidas del Consorcio RNAi (TRC)/Instituto Broad a través de la instalación central de UMMS RNAi) específicas para *GDF6* (GDF6.1: TRCN0000141818, secuencia diana: GCCAAGTGTACATTGAGCTT (SEQ ID NO:10); GDF6.2: TRCN0000140097, secuencia diana: GTGTCCATGCTCTCAGACAAA (SEQ ID NO:11)) o *SMAD1* (SMAD1.1: TRCN0000021781, secuencia diana: CGTTGCTTATGAGGAACCAA (SEQ ID NO:12); SMAD1.2: TRCN0000021782, secuencia diana: GCCGATGGACACAAACATGAT (SEQ ID NO:13)) o *EGFP* (TRCN0000072181, secuencia diana: ACAACAGCCACAACGTCTATA (SEQ ID NO:14)). El virus se preparó mediante el uso de un sistema de empaquetamiento lentiviral de segunda generación en células HEK293T y se tituló media de un kit ELISA p24 (Clontech). Las células se infectaron con virus a una multiplicidad de infección de 2,5 con 8 µg/ml de polibreno seguido de selección con puromicina (2 µg/ml) durante 2 días en medios apropiados. Para la sobreexpresión, se usó la clonación de Gateway (Life Technologies) para insertar el ORF de *GDF6* (GE life sciences) o el ORF de *SMAD1DVD* (proporcionado por Takenobu Katagiri) en el vector pLenti CMV Hygro DEST (w117-1) (proporcionado por Paul Kaufman). La infección y el monitoreo se realizaron como se describe (C. J. Ceol y otros, The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. (Nature 471, 513-517 (2011)), excepto que la selección se realizó con 300 ug/ml de higromicina durante 10 días.

35 Curva de crecimiento, ensayos clonogénicos y en agar blando

Para las curvas de crecimiento, se sembraron 50 000 células vivas por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos en el día 0. El número de células vivas se calculó todos los días mediante el uso de un contador de células automatizado (Nexcelom Bioscience Cellometer Auto T4) siguiendo los procedimientos estándar. Todos los ensayos se realizaron con replicados técnicos. Para los ensayos clonogénicos, se sembraron 3000 células vivas en una placa de cultivo de tejidos de 10 cm. Después de 3 semanas, las colonias se fijaron y se tiñeron mediante el uso de azul de bromofenol en acetona. ImageJ se usó para cuantificar el número de colonias. En los ensayos con tratamiento con DMH1, el control o los medios que contenían DMH1 se reemplazaron cada dos días. Para los ensayos en agar blando se usó una capa inferior al 0,5 % (1:1 con agar al 1 % y 2X DMEM con FBS al 20 %) y una capa superior al 0,3 % (1:1 con agar al 0,6 % y 2X DMEM con FBS al 20 %). Se añadieron 3000 células vivas por pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos en la capa superior. Los medios se añadieron inicialmente y después se reemplazaron cada 3 días. Después de 3 semanas, las colonias se tiñeron con cloruro de tetrazolio nitroblue durante la noche a 37 °C. Una vez teñidos, se fotografiaron pozos individuales, y se usó ImageJ para contar el número de colonias. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado y los experimentos se repitieron al menos dos veces. Se ha mostrado una imagen representativa de cada uno.

Ensayos de muerte celular

Las células de melanoma A375 después de la atenuación de *GDF6* o *SMAD1* o *EGFP* se tiñeron para Anexina V y 7-AAD (kit de detección de apoptosis con anexina V de BD Pharmingen PR) según las instrucciones del fabricante, seguido de citometría de flujo mediante el uso de un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences). La actividad de Caspasa3/7 se midió mediante el uso del ensayo Caspasa-Glo 3/7 (Promega) según las instrucciones del fabricante.

Experimentos con animales

60 Todos los protocolos con animales fueron aprobados por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de UMMS (A-2016, A-2171). Los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos experimentales individuales. No se realizó el cegamiento ya que los grupos de animales se identificaron mediante etiquetado y marcado en jaula. Los animales se excluyeron, de acuerdo con criterios preestablecidos, si el volumen del tumor alcanzaba >1,000 mm³; si el tamaño o la ubicación del tumor afectaban la movilidad o la salud general del animal, el animal fue sacrificado y excluido del experimento o se terminó el experimento completo. Las células A375 que expresan establemente un ARNsh de *EGFP* o

GDF6 o *SMAD1* y/o vector vacío o vector de expresión de *GDF6* vector de sobreexpresión de *SMAD1DVD* se inyectaron por vía subcutánea en los flancos de ratones hembra BALB/c nu/nu de 6-8 semanas de edad (Granjas Taconic) para producir un tumor primario ortotópico. El crecimiento del tumor primario se monitoreó cada 3 días con calibradores, y el volumen del tumor se calculó como se describió anteriormente (C. Gazin, N. Wajapeyee, S. Gobeil, C. M. Virbasius, M. R. Green, An elaborate pathway required for Ras-mediated epigenetic silencing. *Nature* 449, 1073-1077 (2007)). Para experimentos de atenuación de *GDF6*, atenuación de *SMAD1* y epistasis, se inyectaron 1×10^7 células vivas. Para experimentos de sobreexpresión de *GDF6*, se inyectaron 1×10^6 células vivas. Para la sobreexpresión de *GDF6* sobreexpresión y atenuaciones de *GDF6*, se muestra un representante de dos experimentos independientes ($n=3$ animales por experimento). Para experimentos con el fármaco DMH1, se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células A375 vivas en los flancos de ratones hembra BALB/c nu/nu. A partir del día en que se inyectaron las células, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con vehículo 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina al 12,5 % o 25 mg/kg de DMH1 en el vehículo cada dos días. El crecimiento del tumor se monitoreó como se describió anteriormente. Este experimento se repitió dos veces y se representa el promedio ponderado de ambos experimentos ($n=8$ en total).

15 Ensayo miniCoopR

El ensayo miniCoopR que mide el efecto de *gdf6b* en el inicio del melanoma en el pez cebra se realizó como se describió anteriormente (C. J. Ceol y otros, The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature* 471, 513-517 (2011)). Para los experimentos de *EGFP* en miniCoopR se representa un promedio ponderado de dos experimentos independientes, y para experimentos de *gdf6b* en miniCoopR se representa un promedio ponderado de cuatro experimentos independientes.

Síntesis de ADNc y qRT-PCR

Para el pez cebra, el ARN total se extrajo de las células de melanoma y de los melanocitos asociados a la escala normal de pez cebra *Tg(mitfa:BRAF(V600E)); p53^{-/-}; alb^{-/-}; Tg(mitfa:EGFP)*. Para el aislamiento de las células de melanoma, los melanomas se diseccionaron, se disociaron mediante el uso del tratamiento con Liberase TH y se sometieron a Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar células positivas para EGFP. Se usó el mismo protocolo para los melanocitos normales, excepto que las escamas dorsales del pez cebra se arrancaron para aislar los melanocitos. El ARN total de melanomas y melanocitos de pez cebra se aisló mediante el uso de extracción con Trizol-cloroformo, seguido de ARN clean up (Qiagen RNeasy). El ARN total se transcribió inversamente mediante el uso del kit Superscript 2 Reverse Transcriptase (Invitrogen). La PCR cuantitativa en tiempo real con la mezcla maestra verde SYBR (Biorad) se realizó mediante el uso de los siguientes cebadores: *gdf6a* F: CTGAGAAACTGGGGCTCAAT, (SEQ ID NO:15) *gdf6a* R: CGACCAGCTCCTCTTTGTCT (SEQ ID NO:16), *gdf6b* F: CGTCTAAGCAGCAAACACC (SEQ ID NO:17), *gdf6b* R: CCAAAGTGGAGAGTTCAAATGG (SEQ ID NO:18), *actb1* F: CGAGCAGGAGATGGGAACC (SEQ ID NO:19), *actb1* R: CAACGGAAACGCTCATTGC (SEQ ID NO:20).

Para células de melanoma humano A375 con modulación de *GDF6* y/o *SMAD1DVD*, el ARN total se preparó de la misma manera y se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real mediante el uso de los siguientes cebadores: *ID1* F: CCAACGCGCCTCGCCGGATC (SEQ ID NO:21), *ID1* R: CTCCTCGCCAGTGCCTCAG (SEQ ID NO:22), *ID3* F: CTGGACGACATGAACCACTG (SEQ ID NO:23), *ID3* R: GTAGTCGATGACGCGCTGTA (SEQ ID NO:24), *GAPDH* F: TGCACCACCAACTGCTTAGC (SEQ ID NO:25), *GAPDH* R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG (SEQ ID NO:26).

Inmunofluorescencia

Para los adultos, las escamas dorsales que portaban melanocitos o melanomas normales se extrajeron del pez cebra anestesiado. Después de la fijación, las escamas se blanquearon con pigmento de melanina para visualizar la fluorescencia después de la tinción. Las escalas se incubaron con anticuerpo primario (Gdf6b (1:250), Mitfa (1:250)) durante la noche. Subsecuentemente, las escalas se lavaron, se incubaron en anticuerpos secundarios apropiados (Jackson Labs), se incubaron con DAPI y se montaron en portaobjetos con Vectashield (Vectorlabs). La fluorescencia se visualizó mediante el uso de microscopía de fluorescencia confocal.

Inmunoelectrotransferencia

Los extractos de proteínas se prepararon como se describió previamente (S. D. Epstein LB, Hunte-McDonough B, Harris CA, Cytokines: A practical approach (Balkwill FR., ed). 81-93 (1991)). Los extractos se separaron en geles SDS-PAGE al 12 %. Las transferencias se probaron con anticuerpos primarios (GDF6 (Sigma PRS4691; 1:1000), fosfo-SMAD1/5/8 (Cell Signaling 13820; 1:1000), SMAD1 (Cell Signaling 9743; 1:500), SMAD1/5/8 total (Santa Cruz sc-6031-R; 1:1000), FLAG (Sigma F3165, 1:2000), GAPDH (Abcam 8245; 1:2000)) durante la noche a 4 °C, se lavaron cinco veces en TBS más Tween al 0,1 % (TBST) y después se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP apropiado (Jackson Labs) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron cinco veces en TBST y se visualizaron en una película de autorradiografía después de incubar con reactivo ECL (Supersignal West Pico o Supersignal West Femto; Thermo Scientific).

65 Inmunohistoquímica (IHC) y tinción TUNEL

A partir de xenoinjertos de ratón, se procesaron tejidos incrustados en parafina fijados con formalina para obtener secciones de 5 µm. Las secciones se tiñeron con H&E, GDF6 (Sigma PRS4691; 1:1000), pSMAD1/5/8 (Sigma 9511; 1:150), caspasa3 escindida (Cell signaling 9664; 1:100), Ki-67 (Dako M7240; 1:100) y se evaluaron. La tinción TUNEL se realizó en secciones mediante el uso del kit de detección de muerte celular in situ (Roche) según el protocolo del fabricante. Para secciones de xenoinjerto de ratón teñidas, se tomaron imágenes de 100 campos independientes de secciones de tres tumores diferentes por genotipo. El número de células positivas a TUNEL o positivas a caspasa 3 o positivas a Ki67 se contaron manualmente y el número total de células en cada campo se calculó mediante el uso del software ImageJ. Los núcleos individuales de melanoma y micromatrizs de tejidos de pacientes consistían en secciones de 5 µm de tejidos fijados con formalina y tejidos incrustados en parafina. Los portaobjetos se desparafinaron primero con dos cambios de xileno, y se rehidrataron con cambios de concentraciones decrecientes de alcoholes, después se enjuagaron en agua destilada. La recuperación de antígeno se realizó con tampón de citrato 0,01 M a pH 6,0 o EDTA 0,001 M a pH 8,0. Los portaobjetos se calentaron en un horno microondas de 770 W durante 14 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se enjuagaron en agua destilada. Las secciones se bloquearon primero para la proteína endógena no específica y la actividad peroxidasa con una aplicación de bloqueo endógeno doble (Dako) durante 10 minutos, seguido de un lavado de tampón seguido de tinción con anticuerpos que reconocen GDF6 (Sigma PRS4691; 1:1000) y p-SMAD1/5/8 (Cell signaling 9664; 1:100) durante 30 minutos. La tinción con un segundo anticuerpo que reconoce GDF6 (Sigma HPA045206; 1:100) arrojó resultados concordantes. Para los controles negativos, se usó tinción con inmunoglobulina G no inmunitaria (un cóctel de IgG entera de ratón e IgG entera de conejo (Pierce antibodies 31204 y 31207, respectivamente; ambos 1 µg/ml)). Después de un lavado con tampón, las secciones se incubaron con el reactivo de detección EnVision+Dual Link (Dako) durante 30 minutos. Las secciones se lavaron y se trataron con una solución de diaminobencidina y peróxido de hidrógeno (Dako) durante 10 minutos, para producir el pigmento marrón visible. Después del enjuague, se usó una solución de tonificación (DAB Enhancer, Dako) durante 2 minutos para enriquecer el color final. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se cubrieron con medios de montaje permanentes. La tinción positiva se definió como un patrón de tinción marrón oscuro, confinado a la región celular esperada. La tinción escasa o fina de fondo granular, o ninguna tinción se consideró negativa. Se procesaron tejidos de pez cebra fijados en formalina, tratados con EDTA 5 mM, incrustados en parafina para obtener secciones transversales de 5 µm. Las secciones se tiñeron como se mencionó anteriormente con GDF6 (Sigma PRS4691; 1:1000) y p-SMAD 1/5/8 (Sigma 9511; 1:150) y también se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se cubrieron con un medio de montaje permanente.

30 Puntuación de IHC

Tanto para la cohorte de pacientes UMass como para el micromatriz de tejidos, se usó un método semicuantitativo visual modificado. Las secciones se puntuaron por inmunointensidad (0-4) e inmunopositividad (0-3), que después se multiplicaron. Para la cohorte de pacientes UMass, la puntuación se realizó por C.J.C y A.M.V, y se promediaron los puntajes. Los puntajes fueron verificados por A.D. Para la cohorte de micromatrizs de tejidos, la puntuación fue realizada independientemente por C.L. y C.B.F.G. y los puntajes se promediaron. Las secciones con puntuaciones menores que o iguales a cuatro se consideraron en el grupo de tinción baja o nula y las secciones con puntuaciones mayores que cuatro se consideraron en el grupo de tinción alta.

40 Diseño de sonda aCGH

Se diseñaron a medida el formato de matriz G3 de sondas 2x400K para el ensamblaje del genoma Zebrafish ZV9 mediante el uso de eArray de Agilent (eArray id# 036041). La matriz tiene 398 426 sondas únicas que cubren el 97 % del genoma del pez cebra (basado en el ensamblaje Zv9). Las sondas tienen 60 bases de largo y están espaciadas a través del genoma con una separación promedio de 3550 bases.

45 aCGH, análisis JISTIC y análisis comparativo

Se realizó aCGH según el protocolo de hibridación de ADN genómico basado en matriz de Agilent. En resumen, se extrajo ADN genómico de melanomas de pez cebra o una región normal del mismo pez mediante el uso del kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue. Se fragmentaron 5 µg de tumor o ADNg normal coincidente a 200-500 pb por sonicación (Covaris S220R High Performance Sample Preparation Ultrasonicator System 220x S), marcado en una reacción cebada al azar mediante el uso de Cy5-dCTP o Cy3-dCTP, respectivamente, y se hibridaron en tampón de hibridación de Agilent con Cot1 ADN (1 mg/ml) a 65 °C durante la noche. A continuación, se lavaron las matrices y se midieron las señales de Cy5 y Cy3 mediante el uso de un escáner de micromatrices Agilent G2565. Los datos sin procesar se generaron a partir de imágenes escaneadas con el software Agilent Feature Extraction (v10.7). Los valores brutos se normalizaron mediante el uso del banco de trabajo Agilent Genomic y se detectaron alteraciones en el número de copias. El algoritmo JISTIC se usó en modo de despegado limitado para calcular regiones significativamente alteradas, y la llamada de pico se realizó mediante el uso de un valor de corte q de 0,25. Las puntuaciones JISTIC G basadas en genes y los valores Q transformados en log10 se representan mediante el uso del paquete Circos (M. Krzywinski y otros, Circos: an information aesthetic for comparative genomics. Genome research 19, 1639-1645 (2009)). Para la representación de datos, la escala de puntuación G para las amplificaciones fue 0 (mínimo) y 1550 (máximo), y para las delecciones fue 0 (mínimo) y 2150 (máximo). La escala de valor Q transformado en log10 tanto para amplificaciones como delecciones fue 0 (mínimo) y 11 (máximo). Para melanomas humanos, los datos del número de copias se descargaron de Tumorscape (R. Beroukhim y otros, The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. Nature 463, 899-905 (2010); W. M. Lin y otros, Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. Cancer research 68, 664-673 (2008)),

y el análisis JISTIC se realizó como se describió anteriormente. Los genes de dentro de los picos se agruparon para definir conjuntos específicos de especies de genes amplificados recurrentemente. Los ortólogos humanos de genes de pez cebra se determinaron mediante el uso de Ensembl (J. E. Collins, S. White, S. M. Searle, D. L. Stemple, Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. *Genome research* 22, 2067-2078 (2012); K. Howe y otros, The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503 (2013)), y se suplementaron al realizar BLAST (S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410 (1990)). Los genes de pez cebra y humanos se amplificaron recurrentemente, según lo determinado por JISTIC, se compararon para encontrar el conjunto de superposición de genes comúnmente amplificados.

Amplificación de ADNc y análisis de expresión génica

El ARN total se extrajo y se preparó a partir de células de melanoma y de melanocitos asociados a escala normal de pez cebra *Tg(mitfa:BRAF(V600E)); p53^{-/-}; alba^{-/-}; Tg(mitfa:EGFP)* como se describió anteriormente. El ARN total se amplificó mediante el uso del sistema de amplificación de ARN Nuva Ovation V2 según el protocolo del fabricante. Para micromatrizs, el ADNc amplificado se hibridó a una micromatriz 385K (NimbleGen 0711105Zv7EXPR) según el protocolo del fabricante. En resumen, el ADNc amplificado de melanomas y melanocitos se marcaron con Cy3 y Cy5 independientemente, se hibridaron con la micromatriz, se lavaron y escanearon con un escáner GenePix 4000B. Las imágenes se analizaron y normalizaron mediante el uso del software NimbleScan, y se identificaron genes expresados de forma diferencial.

Secuenciación de ARN paralela masiva

Para melanomas y melanocitos de pez cebra, se aisló el ARN total como se describió anteriormente y las bibliotecas se prepararon mediante el uso del kit de preparación de biblioteca de ARNm TrueSeq Stranded según el protocolo del fabricante (Illumina). Los archivos FASTQ se analizaron mediante el uso de FASTQC v0.10.1 (A. S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data (2010)) para garantizar una calidad de lectura uniforme (phred > 30). Las lecturas de extremos emparejados se alinearon con el genoma del pez cebra mediante el uso de STAR v2.3A. Dobin y otros, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. (*Bioinformatics* (Oxford, Inglaterra) 29, 15-21 (2013)) (Zv9). Las lecturas mapeadas se contaron mediante el uso de htseq-count (v0.6.0, parámetros -t exon) (S. Anders, P. T. Pyl, W. Huber, HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 31, 166-169 (2015)) y modelos genéticos del transcriptoma Ensembl (K. Howe y otros, The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. (*Nature* 496, 498-503 (2013)). Los análisis de la expresión diferencial de genes se realizaron mediante el uso de DESeq2 (M. E. Ritchie y otros, limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research* 43, e47 (2015)). La ortología con respecto a genes humanos se determinó mediante el uso de Ensembl (J. E. Collins, S. White, S. M. Searle, D. L. Stemple, Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. *Genome research* 22, 2067-2078 (2012); K. Howe y otros, The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503 (2013)), y complementado al realizar BLAST (S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool. (*Journal of molecular biology* 215, 403-410 (1990)). El mapa de calor de los genes de la vía de BMP (REACTOME_SIGNALING_BY_BMP; MSigDB (Instituto Broad)) se desarrolló con la expresión de ortólogos humanos de genes de la vía de BMP de peces. Los ortólogos de peces de genes humanos representados son *SMAD5=smad5*, *SMAD4=si:dkey-239n17.4*, *ACVR2A=acvr2a*, *ACVR2B=acvr2b*, *BMPR1A=bmpr1aa*, *FSTL1=fstl1b*, *SMAD7=smad7*, *BMPR2=bmpr2a*, *SMURF2=smurf2*, *SMAD6=smad6b*, *ZFYVE16=zfyve16*, *SKI=skib*, *GREM2=grem2*, *SMURF1=smurf1*, *UBE2D1=ube2d1*, *CER1=dand5*, *NOG=nog*, *BMP2=bmp2b*, *BMPR1B=bmpr1bb*. Para células de melanoma humano A375 con modulación de *GDF6* y/o *SMAD1DVD*, se aisló el ARN total y se prepararon bibliotecas como se describió anteriormente. Las bibliotecas preparadas se secuenciaron mediante el uso de la tecnología Illumina HiSeq (NY Genome Center). FASTQC v0.10.1 (A. S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (2010)) se usó en las secuencias FASTQ para las muestras A375 para generar informes de calidad de secuencia. Los datos se analizaron mediante el uso de dos tuberías bioinformáticas diferentes. En la primera tubería, las lecturas se alinearon con el genoma de referencia humano (Ensembl GRCh37) mediante el uso de Bowtie2 (v 2-2.1.0) (B. Langmead, S. L. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* 9, 357-359 (2012)) y Tophat2 (v 2.0.9) (D. Kim y otros, TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. (*Genome biology* 14, R36 (2013)). Samtools (v 0.0.19) (H. Li y otros, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* (Oxford, England) 25, 2078-2079 (2009)) e IGV (v 2.3.60) (H. Thorvaldsdottir, J. T. Robinson, J. P. Mesirov, Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics* 14, 178-192 (2013)) se usaron para indexar los archivos de alineación y ver las lecturas alineadas, respectivamente. La expresión génica se cuantificó como fragmentos por kilobase de modelo de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM) mediante el uso de Cufflinks (v 2.2.0) (C. Trapnell y otros, Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 7, 562-578 (2012)). Los genes expresados de forma diferencial se identificaron mediante el uso de las herramientas Cufflinks (Cuffmerge y Cuffdiff). erbund (v 2.4.1) (C. Trapnell y otros, Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 7, 562-578 (2012)) se usó para evaluar la concordancia replicada. En la segunda tubería, las lecturas se mapearon contra el genoma de referencia humano (Ensembl GRCh37) mediante el uso del alineador STAR (v 2.4.2a), y se obtuvieron recuentos a nivel genético de lecturas mapeadas de manera única mediante el uso de htseq-count (v 0.6.1) (S. Anders, P. T. Pyl, W. Huber, HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* (Oxford,

England) 31, 166-169 (2015)). El análisis de expresión diferencial se realizó mediante el uso de DESeq2 (M. I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15, 550 (2014)) para cada condición por pares mediante el uso de un umbral p -adj de 0,05. El método basado en FPKM y el método basado en conteos generaron resultados concordantes. Los análisis que usan el método basado en FPKM se han representado en los resultados.

Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes y análisis de vías

Para GSEA, la puntuación de enriquecimiento (ES), la puntuación de enriquecimiento normalizado (NES) y la tasa de error familiar (FWER) se calcularon en función de una métrica en ejecución, que aumentó cuando se encontró un gen (línea vertical en la representación gráfica) en el conjunto de genes y disminuyó cuando uno no estaba. Para GSEA de la firma de genes de la vía apoptótica, se realizó una lista de genes ordenada por rango con valores de FPKM de células de melanoma A375 que sobreexpresan *GDF6* en comparación con las células de control de vector vacío o las células A375 que expresan un ARNsh que se dirige a *EGFP* en comparación con células que expresan shARN de *GDF6.1*. Se usaron los parámetros predeterminados de GSEA y los parámetros de la prueba- t de Student se usó para calcular la significancia. El análisis de la ruta se realizó mediante el uso del kit de herramientas de análisis WEB-based Gene Set (WebGestalt) (J. Wang, D. Duncan, Z. Shi, B. Zhang, WEB-based GENE Set Analysis Toolkit (WebGestalt): actualización 2013. *Nucleic acids research* 41, W77-83 (2013); B. Zhang, S. Kirov, J. Snoddy, WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic acids research* 33, W741-748 (2005)). Se usaron parámetros predeterminados, excepto que el número mínimo de genes para una categoría se estableció en 10. Para GSEA basado en muestras TCGA, se derivó una lista de genes ordenada por rango a partir de los perfiles de expresión de 385 muestras de melanoma, mediante el uso del nivel de expresión de *GDF6* como una variable continua. Se usaron parámetros predeterminados de GSEA y se usó la correlación de Pearson para calcular la significancia.

Análisis de transcriptoma de melanocitos y melanomas humanos

Se descargaron trescientas ochenta y cinco muestras RNA-seq humanas del Cancer Genomics Hub (CGHub) (cghub.ucsc.edu) mediante el uso de GeneTorrent (v 3.8.5a). El conjunto de datos de RNA-seq y TCGA se compone de tres tipos de muestra: 302 muestras de melanoma metastásico, 82 melanomas primarios y 1 tejido sólido normal (Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681-1696 (2015)). Para los conjuntos de datos de melanocitos normales, se descargaron dos muestras RNA-seq del Short Read Archive (SRA) (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/; códigos de acceso: SRR522118, SRR522119) (T. Barrett y otros, NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic acids research* 41, D991-995 (2013)) y cuatro del proyecto ENCODE (www.encodeproject.org/; experimento: ENCSR000CUQ) (An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74 (2012)). Los conjuntos de datos descargados de TCGA, SRA y ENCODE se alinearon con el genoma de referencia humano (Ensembl GRCh37) y se analizaron mediante el método basado en FPKM descrito anteriormente.

Listado de secuencias

<110> Ceol, Craig Venkatesan, Arvind
 <120> ENFOQUE DIRIGIDO A GDF6 Y A SEÑALIZACIÓN DE BMP PARA LA TERAPIA CONTRA EL MELANOMA
 <130> UM9-202PC
 <150> 62/130,749
 <151> 2015-03-10
 <150> 62/209,789
 <151> 2015-08-25
 <150> 62/245,614
 <151> 2015-10-23
 <150> 62/164,304
 <151> 2015-05-20
 <160> 26
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

	gccaagtgtt acattgagct t	21
	<210> 2	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
10	gtgtccatgc tctcagacaa a	21
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
	acaacagcca caacgtctat a	21
	<210> 4	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
25	cgggtgctta tgaggaacca a	21
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
	gccgatggac acaaacatga t	21
35	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 6	
	tctctgaacc aaacaagca	19
	<210> 7	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
50	tgtggttct cattatcct	19
	<210> 8	
	<211> 532	
	<212> PRT	
55	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	

ES 2 805 206 T3

	Met	Pro	Gln	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Ile	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Tyr	Leu	Phe	
	1				5					10					15		
5	Ile	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Gly	Gln	Asn	Leu	Asp	Ser	Met	Leu	His	Gly	
				20					25					30			
	Thr	Gly	Met	Lys	Ser	Asp	Ser	Asp	Gln	Lys	Lys	Ser	Glu	Asn	Gly	Val	
10			35					40					45				
	Thr	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Thr	Leu	Pro	Phe	Leu	Lys	Cys	Tyr	Cys	Ser	
		50					55					60					
15	Gly	His	Cys	Pro	Asp	Asp	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Cys	Ile	Thr	Asn	Gly	
	65					70					75					80	
	His	Cys	Phe	Ala	Ile	Ile	Glu	Glu	Asp	Asp	Gln	Gly	Glu	Thr	Thr	Leu	
20					85					90					95		
	Ala	Ser	Gly	Cys	Met	Lys	Tyr	Glu	Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Cys	Lys	Asp	
				100					105					110			
25	Ser	Pro	Lys	Ala	Gln	Leu	Arg	Arg	Thr	Ile	Glu	Cys	Cys	Arg	Thr	Asn	
			115					120					125				

ES 2 805 206 T3

	Leu	Cys	Asn	Gln	Tyr	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Val	Val	Ile	Gly
	130						135					140				
5	Pro	Phe	Phe	Asp	Gly	Ser	Ile	Arg	Trp	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Ser	Met
	145					150					155					160
	Ala	Val	Cys	Ile	Ile	Ala	Met	Ile	Ile	Phe	Ser	Ser	Cys	Phe	Cys	Tyr
10					165					170					175	
	Lys	His	Tyr	Cys	Lys	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Arg	Arg	Tyr	Asn	Arg	Asp
				180					185					190		
15	Leu	Glu	Gln	Asp	Glu	Ala	Phe	Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp
			195					200					205			
	Leu	Ile	Asp	Gln	Ser	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Leu
20		210					215					220				
	Leu	Val	Gln	Arg	Thr	Ile	Ala	Lys	Gln	Ile	Gln	Met	Val	Arg	Gln	Val
	225					230					235					240
25	Gly	Lys	Gly	Arg	Tyr	Gly	Glu	Val	Trp	Met	Gly	Lys	Trp	Arg	Gly	Glu
					245					250					255	
	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Val	Phe	Phe	Thr	Thr	Glu	Glu	Ala	Ser	Trp	Phe
30				260					265					270		
	Arg	Glu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gln	Thr	Val	Leu	Met	Arg	His	Glu	Asn	Ile
35			275					280					285			
	Leu	Gly	Phe	Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Gly	Thr	Gly	Ser	Trp	Thr	Gln
		290					295					300				
40	Leu	Tyr	Leu	Ile	Thr	Asp	Tyr	His	Glu	Asn	Gly	Ser	Leu	Tyr	Asp	Phe
	305					310					315					320
	Leu	Lys	Cys	Ala	Thr	Leu	Asp	Thr	Arg	Ala	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Tyr
45					325					330					335	
	Ser	Ala	Ala	Cys	Gly	Leu	Cys	His	Leu	His	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gly	Thr
				340					345					350		
50	Gln	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ala	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Ser	Lys	Asn	Ile
			355					360					365			
55	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Gly	Ser	Cys	Cys	Ile	Ala	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala
		370					375					380				

ES 2 805 206 T3

	Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Val Pro Leu Asn Thr	385	390	395	400
5	Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser	405	410	415	
10	Leu Asn Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser	420	425	430	
15	Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly	435	440	445	
20	Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp	450	455	460	
25	Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg	465	470	475	480
30	Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val	485	490	495	
35	Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu	500	505	510	
40	Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln	515	520	525	
45	Asp Val Lys Ile	530			
45	Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser	1	5	10	15
50	Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly Val Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr	20	25	30	
55	Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser Gly His Cys Pro Asp Asp Ala	35	40	45	
	Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly His Cys Phe Ala Ile Ile Glu	50	55	60	

<210> 9
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

ES 2 805 206 T3

	Glu	Asp	Asp	Gln	Gly	Glu	Thr	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Cys	Met	Lys	Tyr
	65					70					75					80
5	Glu	Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Cys	Lys	Asp	Ser	Pro	Lys	Ala	Gln	Leu	Arg
					85					90					95	
10	Arg	Thr	Ile	Glu	Cys	Cys	Arg	Thr	Asn	Leu	Cys	Asn	Gln	Tyr	Leu	Gln
				100					105					110		
15	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Val	Val	Ile	Gly	Pro	Phe	Phe	Asp	Gly	Ser	Ile
			115					120					125			
20	Arg	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
		130					135					140				
25	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
	145					150					155					160
30	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				165						170					175	
35	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
				180					185					190		
40	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
			195					200					205			
45	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	210						215					220				
50	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
	225					230					235					240
55	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				245						250					255	
60	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
				260					265					270		
65	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			275					280					285			
70	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	290						295					300				
75	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys

ES 2 805 206 T3

	305		310		315		320
5	Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys	325	330	335		
10	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	340	345	350			
15	Ser Leu Ser Pro Gly Lys	355					
20	<210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético <400> 10 gccaaagtgt acattgagct t 21						
25	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético <400> 11 gtgtccatgc tctcagacaa a 21						
30	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético <400> 12 cggttgctta tgaggaacca a 21						
35	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético <400> 13 gccgatggac acaaacatga t 21						
40	<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido sintético <400> 14						
45							
50							
55							
60							
65							

acaacagcca caacgtctat a 21

5 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 15
ctgagaaact ggggctcaat 20

15 <210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 16
cgaccagctc ctctttgtct 20

25 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 17
cgtctaaagc agcaaacacc 20

35 <210> 18
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> oligonucleótido sintético

45 <400> 18
ccaaagtgga gagttcaaat gg 22

50 <210> 19
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

55 <400> 19
cgagcaggag atgggaacc 19

60 <210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

65 <400> 20

caacggaaac gctcattgc 19

5 <210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 21
ccaacgcgcc tcgccgcatc 20

15 <210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 22
ctcctcgcca gtgcctcag 19

25 <210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 23
ctggacgaca tgaaccactg 20

35 <210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> oligonucleótido sintético

45 <400> 24
gtagtcgatg acgcgctgta 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

55 <400> 25
tgcaccacca actgcttagc 20

<210> 26
<211> 21
<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

65 <400> 26

ggcatggact gtggtcatga g 21

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de GDF6 para su uso en el tratamiento de un melanoma en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de dicho inhibidor.
2. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un mamífero no humano o un ser humano.
3. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 1, en donde la inhibición de la actividad de GDF6 provoca la apoptosis de al menos una célula de melanoma.
4. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 1, en donde la inhibición de la actividad de GDF6 reduce la señalización corriente abajo de un receptor de BMP con el que interactúa GDF6 cuando se compara con un control adecuado.
5. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 4, en donde la reducción de la actividad de GDF6 reduce la fosforilación de SMAD1/5/8.
6. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 1, en donde el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico antisentido, un polipéptido de receptor soluble y una molécula pequeña.
7. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico antisentido se selecciona del grupo que consiste en un ARNi, una ribozima, una molécula de ácido nucleico α -anomérico y un ácido nucleico peptídico.
8. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 7, en donde la molécula antisentido es una molécula de ARNi y es un ARNip o un ARNsh.
9. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 6, en donde el polipéptido de receptor soluble comprende un polipéptido de ALK3.
10. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 9, en donde el polipéptido de receptor soluble comprende un polipéptido de fusión ALK3(24-152)-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.
11. Un inhibidor de GDF6 para su uso en el tratamiento de un melanoma en un sujeto, que comprende
(a) obtener una muestra de un área sospechosa de la piel del sujeto;
(b) determinar la presencia de GDF6;
(c) obtener un control adecuado;
(d) comparar la presencia de GDF6 en la muestra de la etapa (b) con el control adecuado de la etapa (c);
(e) determinar si el sujeto presenta un melanoma, en donde la presencia de GDF6 en la muestra pero no en el control adecuado indica melanoma;
(f) tratar al sujeto con dicho inhibidor de GDF6 para inhibir GDF6 si el sujeto tiene melanoma.
12. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 11, en donde el sujeto es un mamífero no humano o el sujeto es un ser humano.
13. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 11, en donde la inhibición de la actividad de GDF6 provoca la apoptosis de al menos una célula de melanoma, o la inhibición de la actividad de GDF6 reduce la señalización corriente abajo de un receptor de BMP con el que GDF6 interactúa cuando se compara con un control adecuado, opcionalmente en donde la reducción de la actividad de GDF6 reduce la fosforilación de SMAD1/5/8.
14. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 11, en donde el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico antisentido, un polipéptido de receptor soluble y una molécula pequeña, opcionalmente en donde el ácido nucleico antisentido se selecciona del grupo que consiste en un ARNi, una ribozima, una molécula de ácido nucleico α -anomérico y un ácido nucleico peptídico, opcionalmente en donde la molécula antisentido es una molécula de ARNi y es un ARNip o un ARNsh.
15. El inhibidor de GDF6 para el uso de la reivindicación 14, en donde el polipéptido de receptor soluble comprende un polipéptido de ALK3, opcionalmente en donde el polipéptido de receptor soluble comprende un polipéptido de fusión ALK3(24-152)-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.

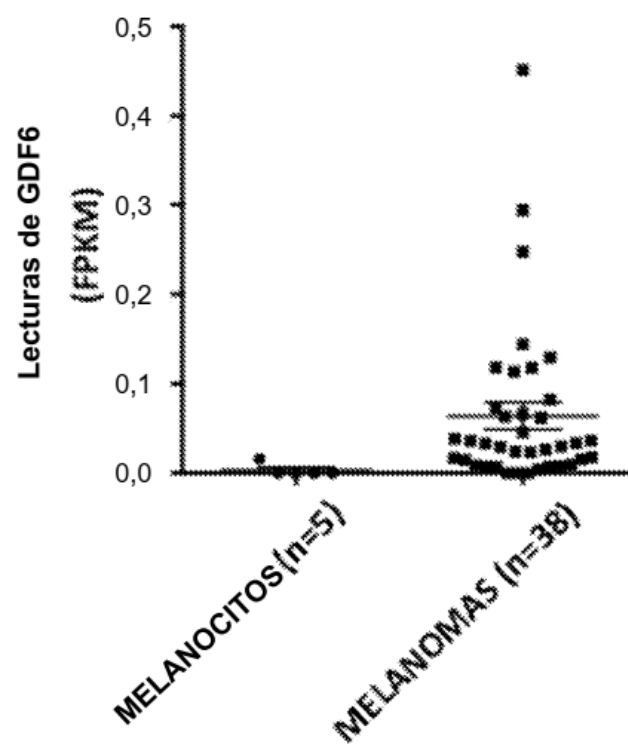


Figura 1

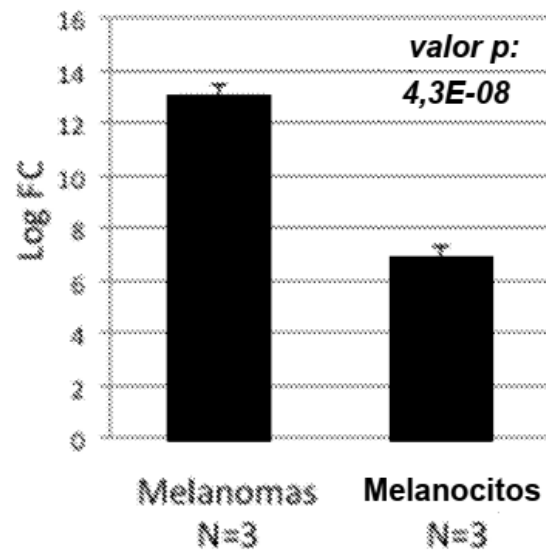


Figura 2

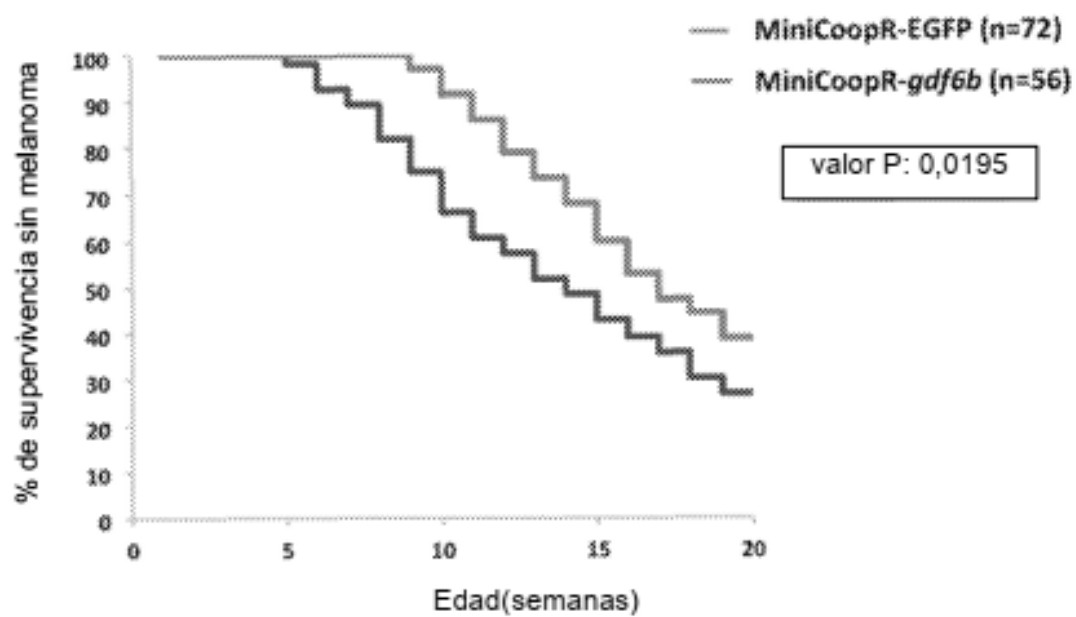


Figura 3

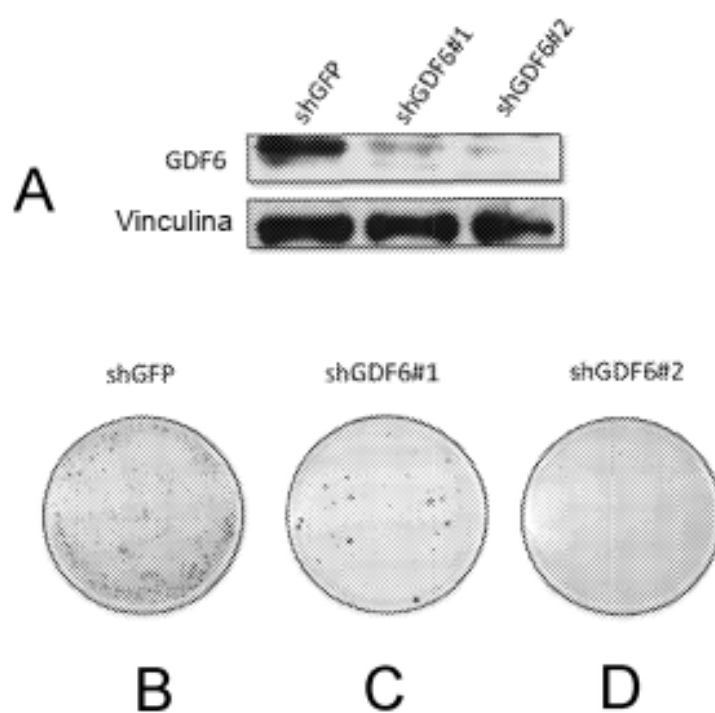


Figura 4

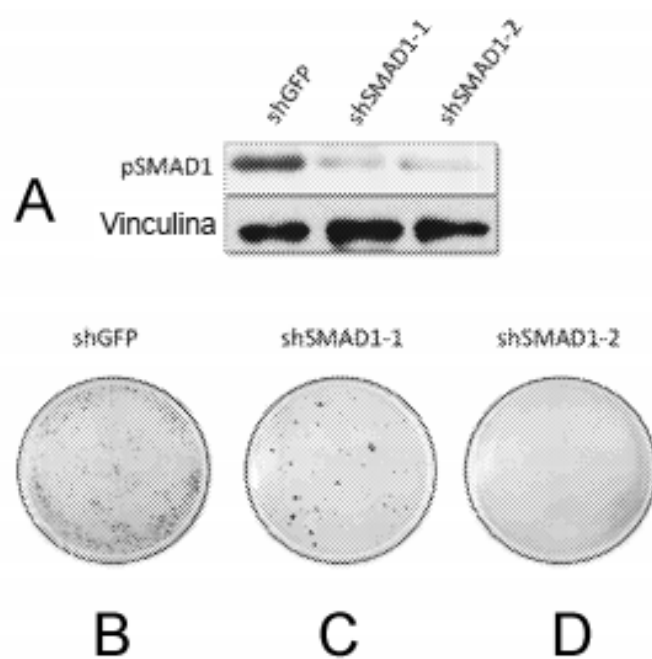


Figura 5

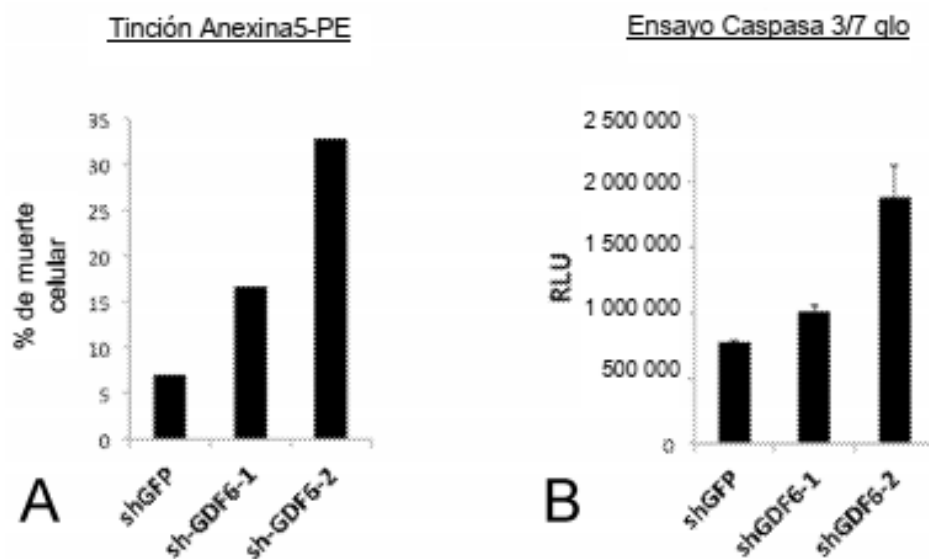


Figura 6

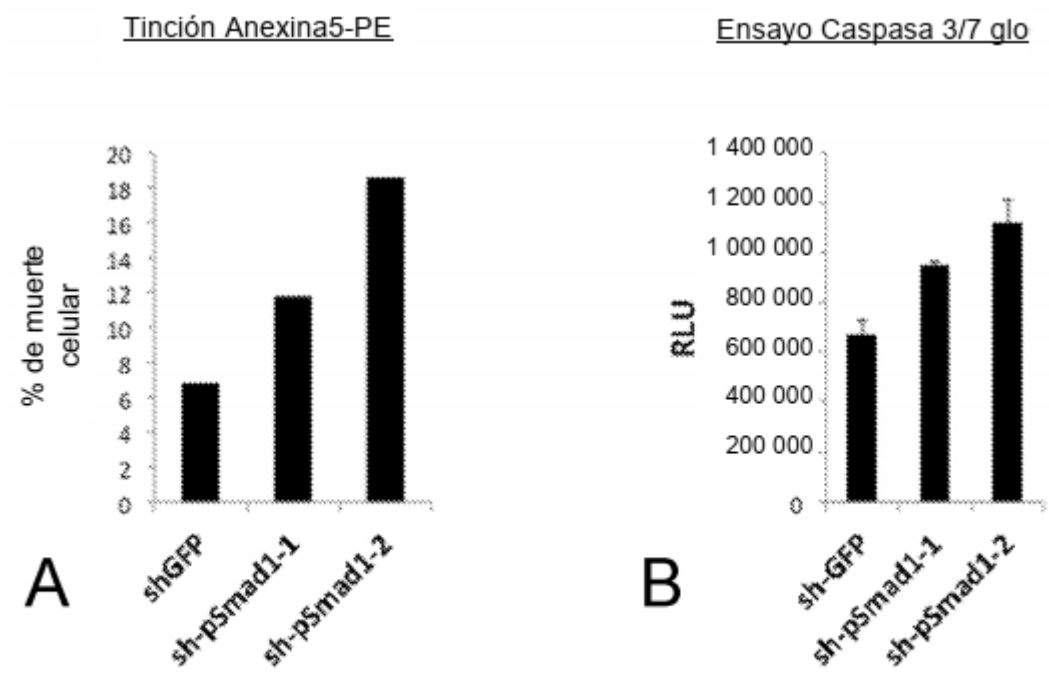


Figura 7

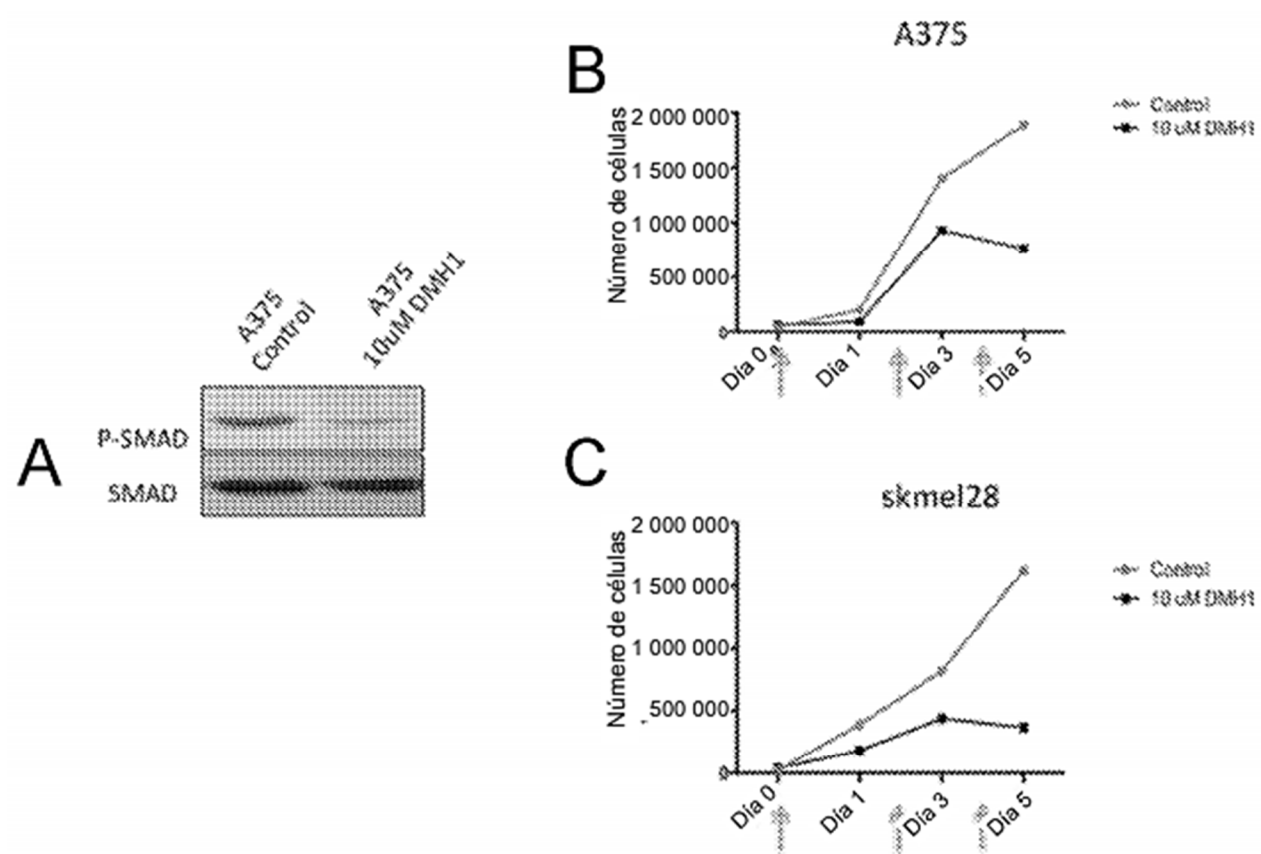


Figura 8

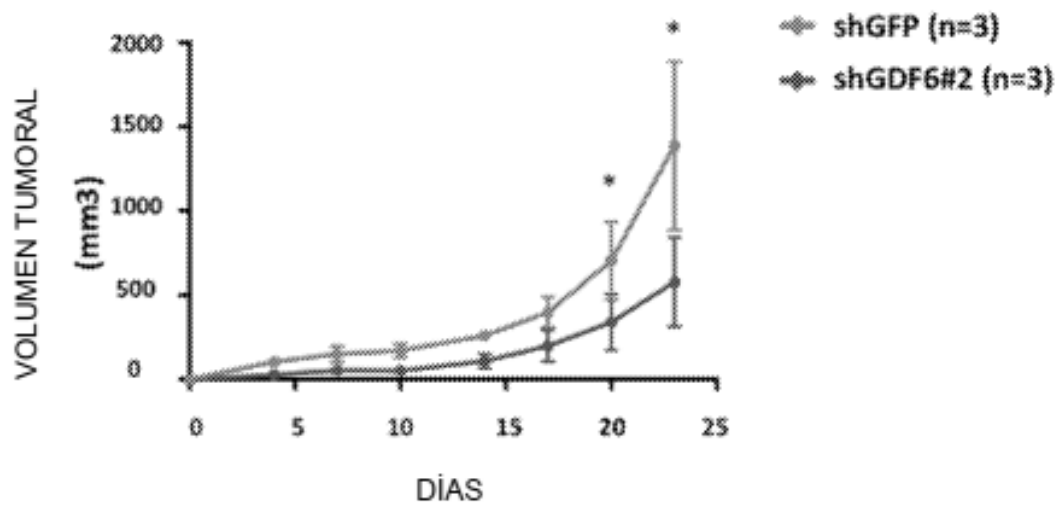


Figura 9

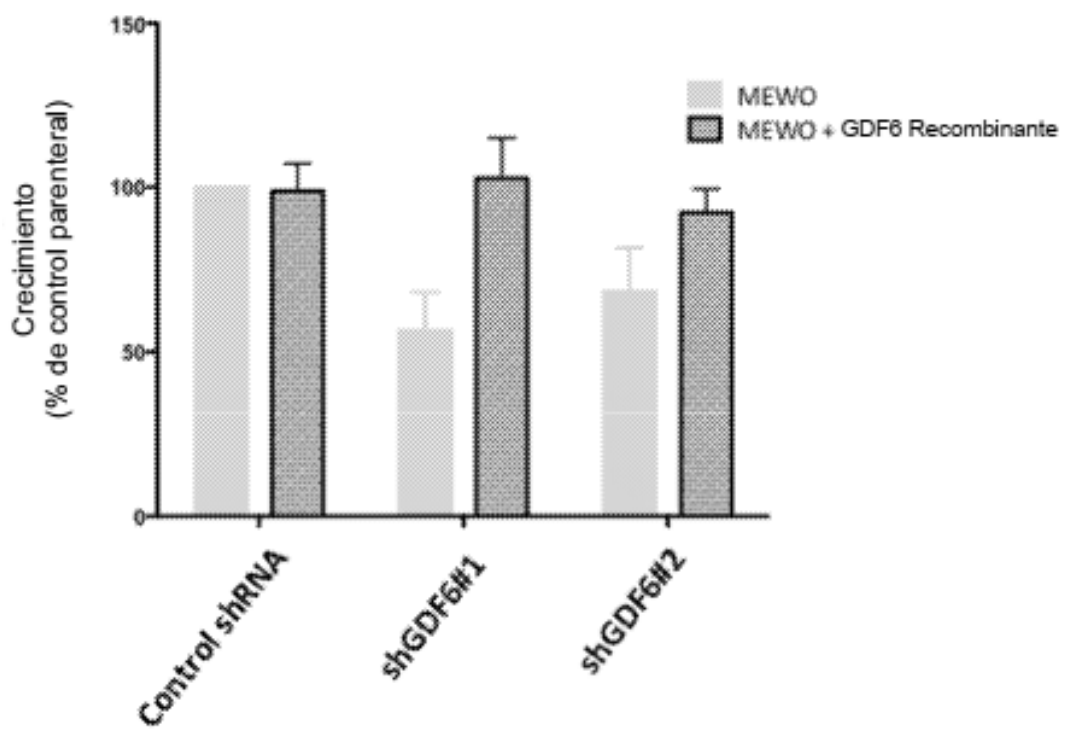
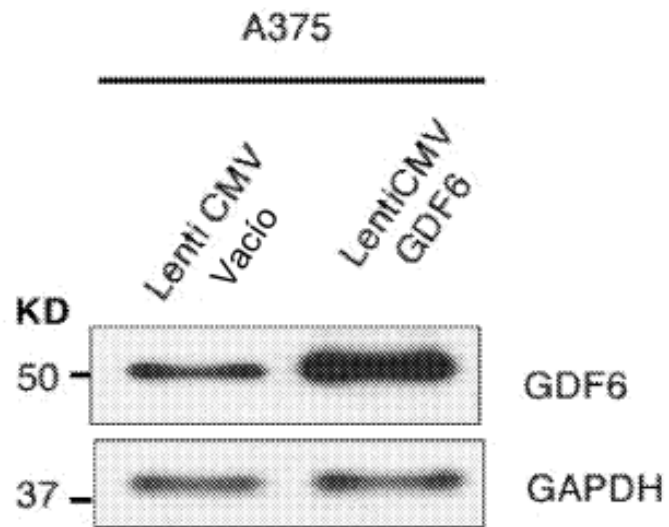


Figura 10

SEQ ID NO:	Secuencia
1	gccaagtgtt acattgagct t
2	gtgtccatgc tctcagacaa a
3	acaacagcca caacgtctat a
4	cgggtgctta tgaggaacca a
5	gccgatggac acaaactga t
6	tctctgaacc aaacaagca
7	tgtggtttct cattatcct

Figura 11

A



B

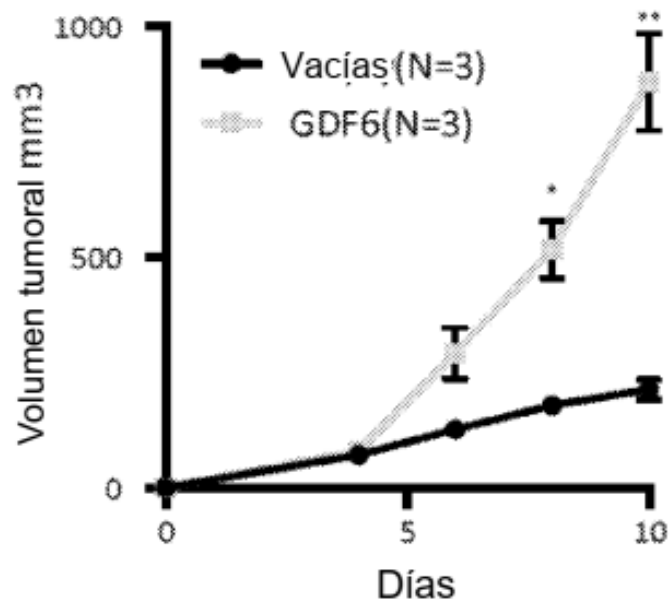


Figura 12

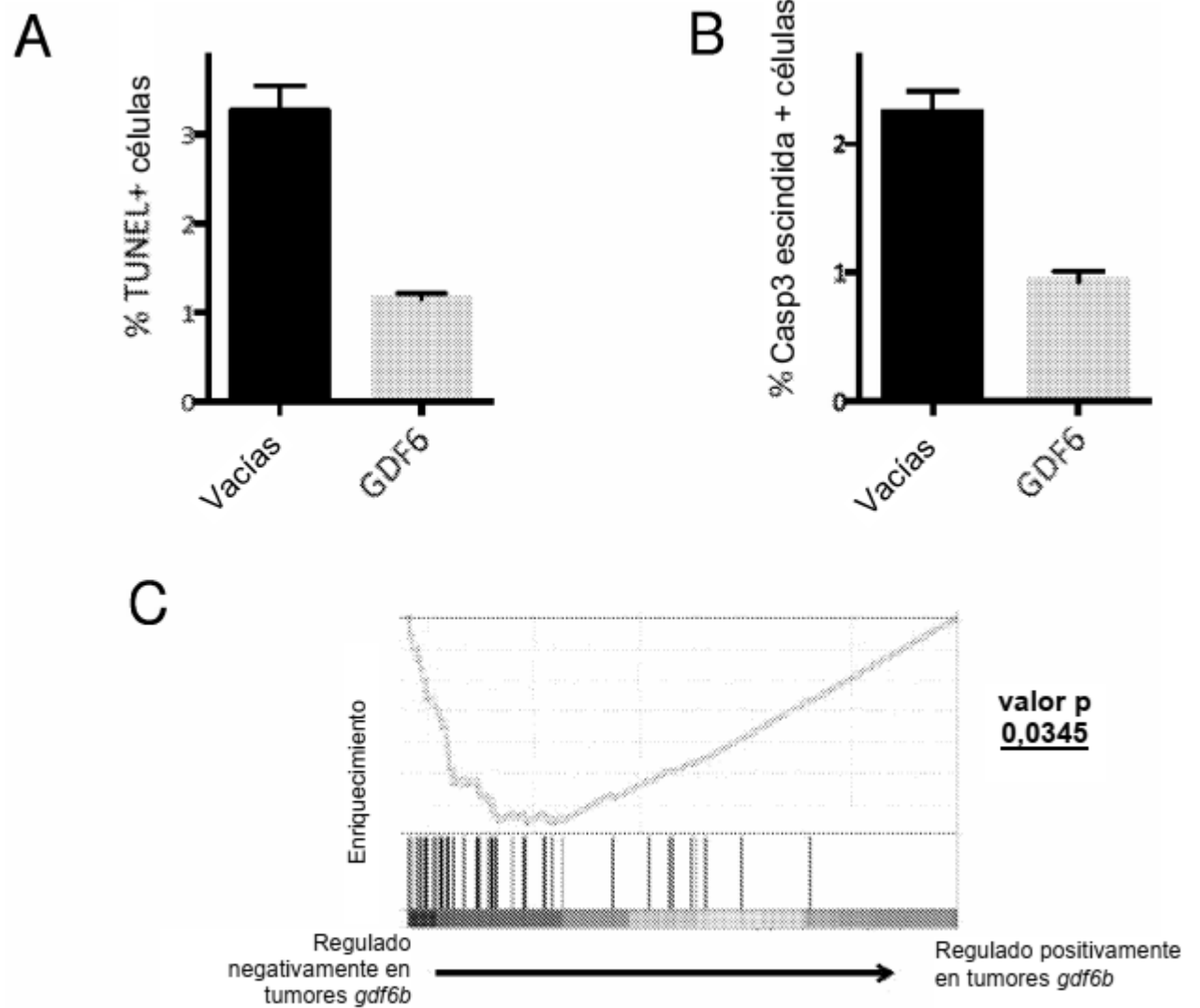


Figura 13

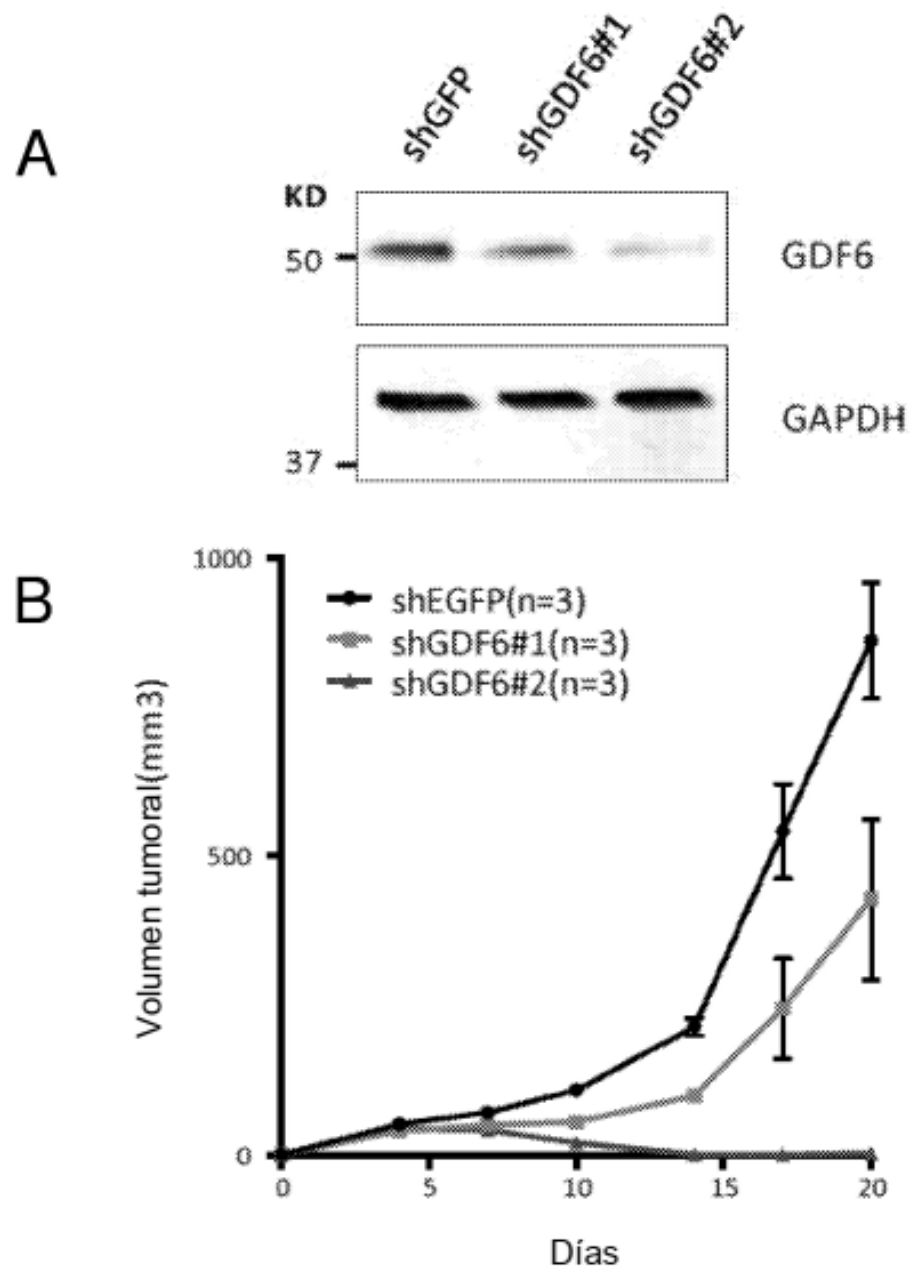
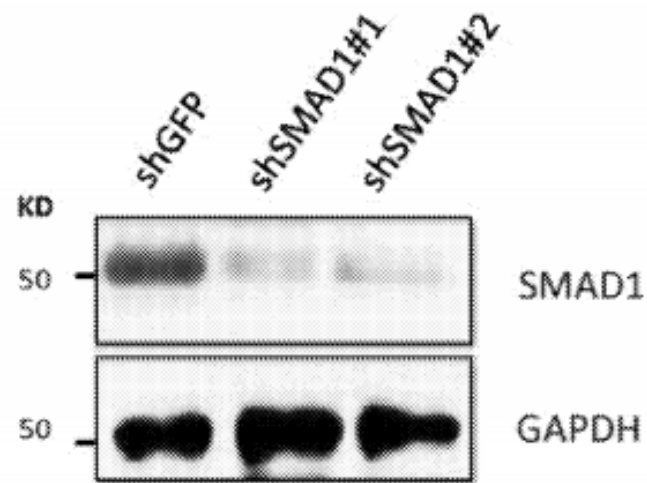


Figura 14

C



D

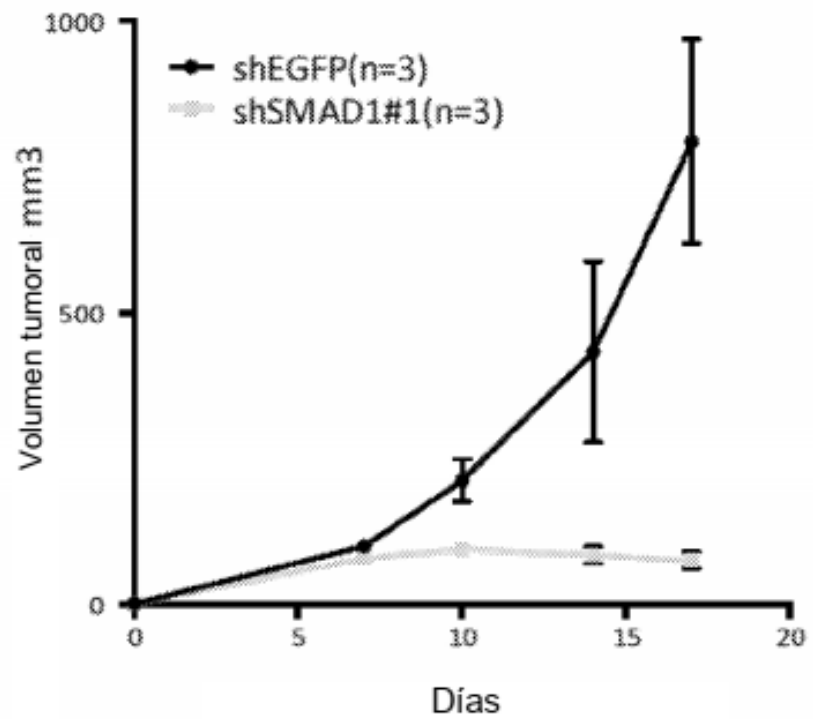


Figura 14 (continuación)

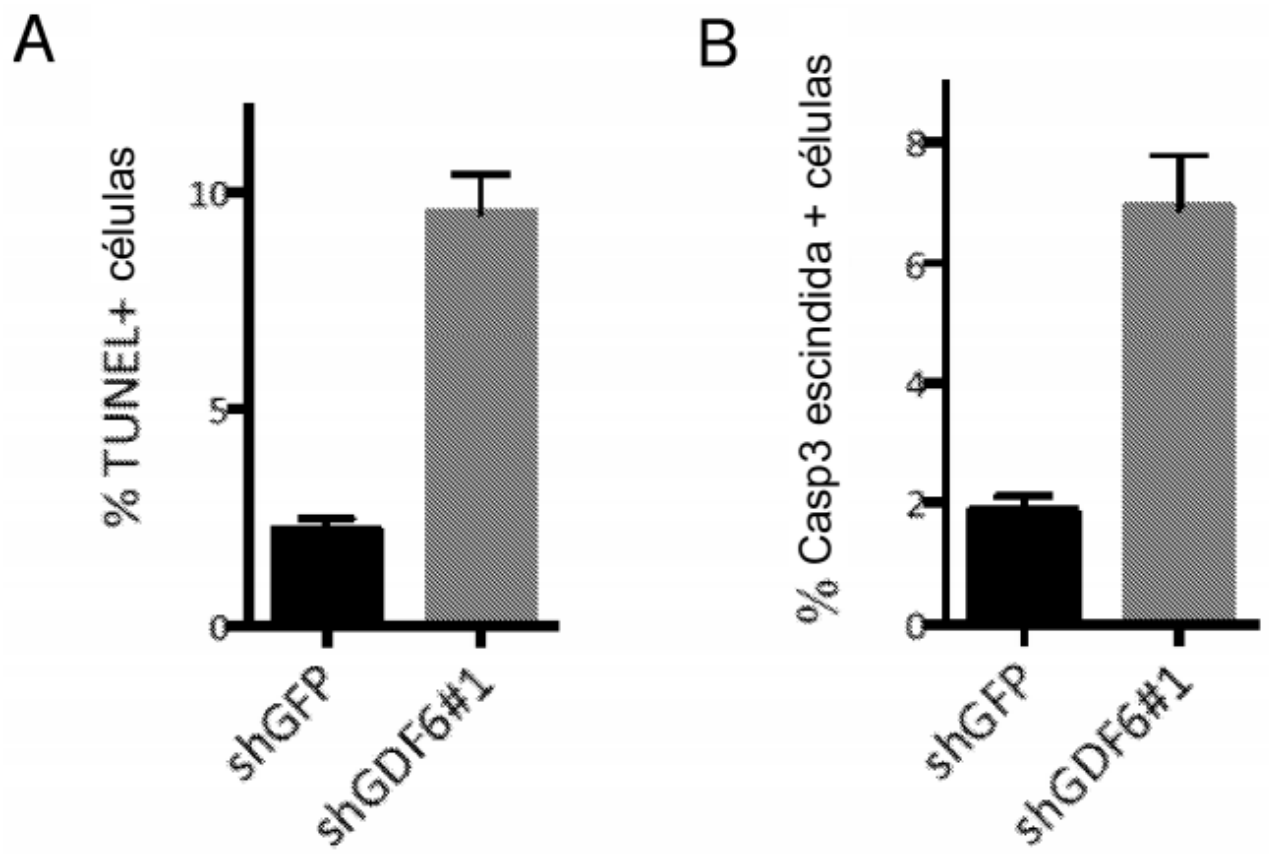


Figura 15

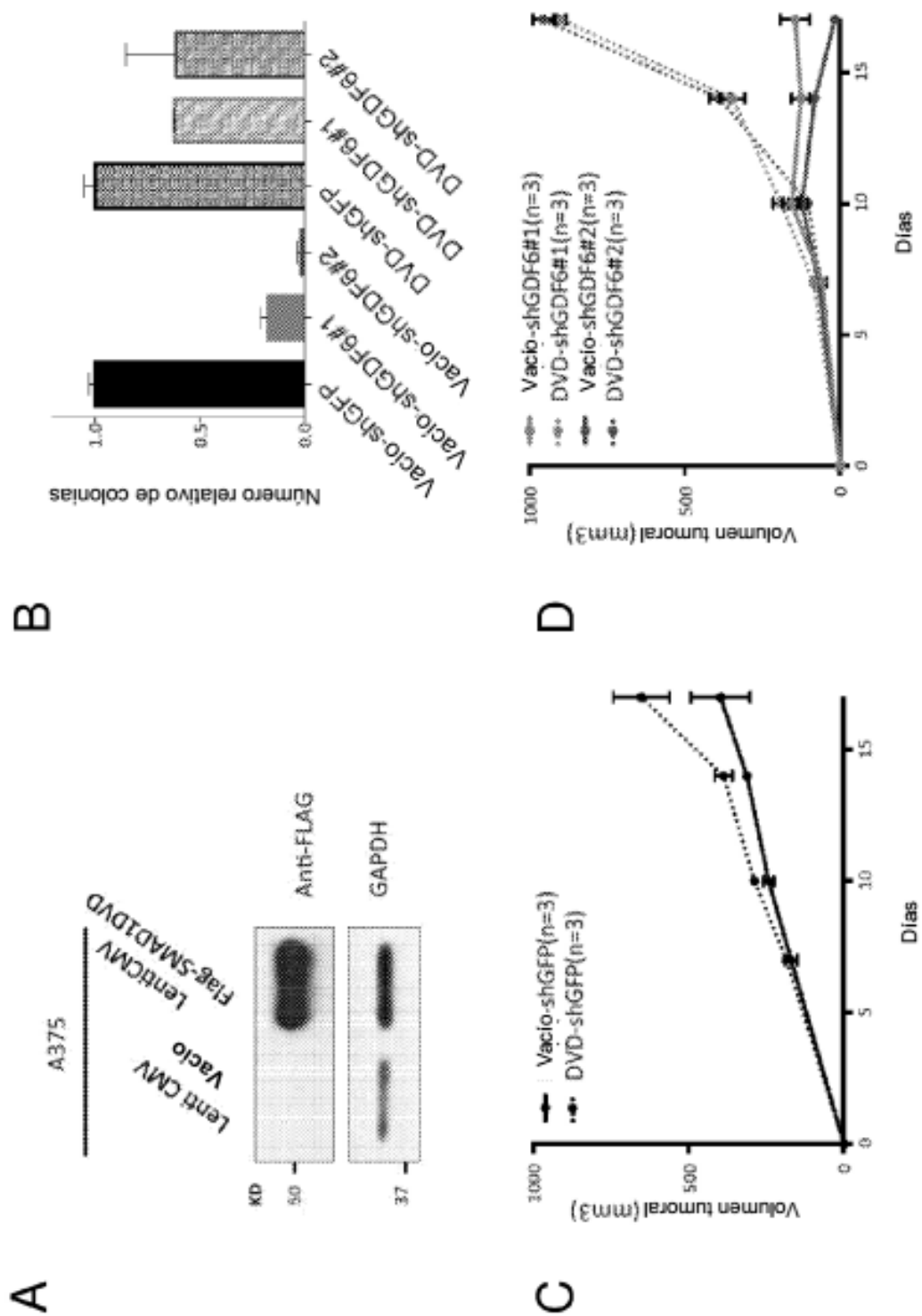


Figura 16

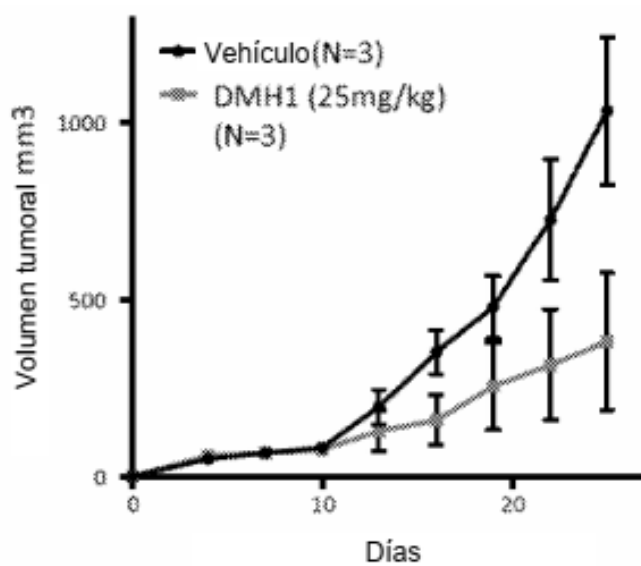


Figura 17

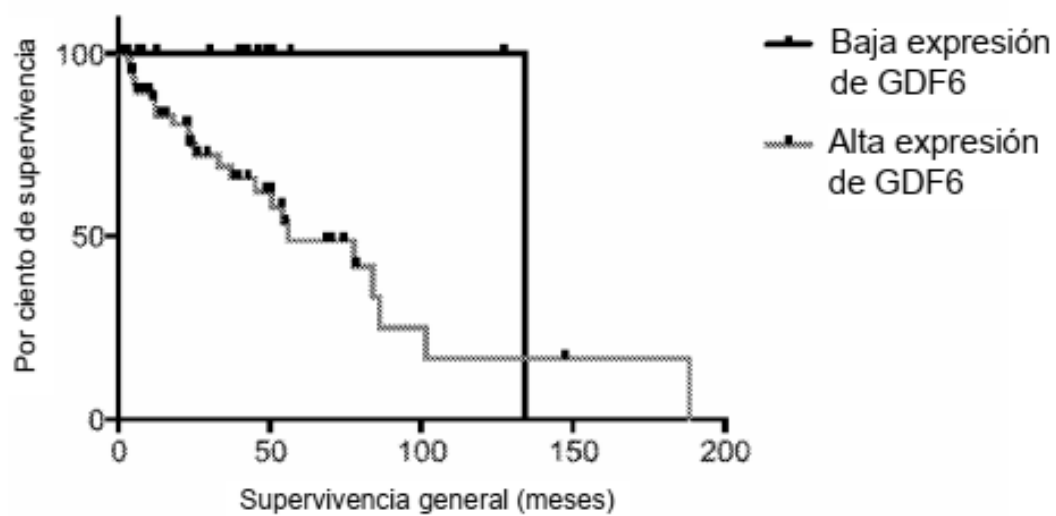


Figura 18

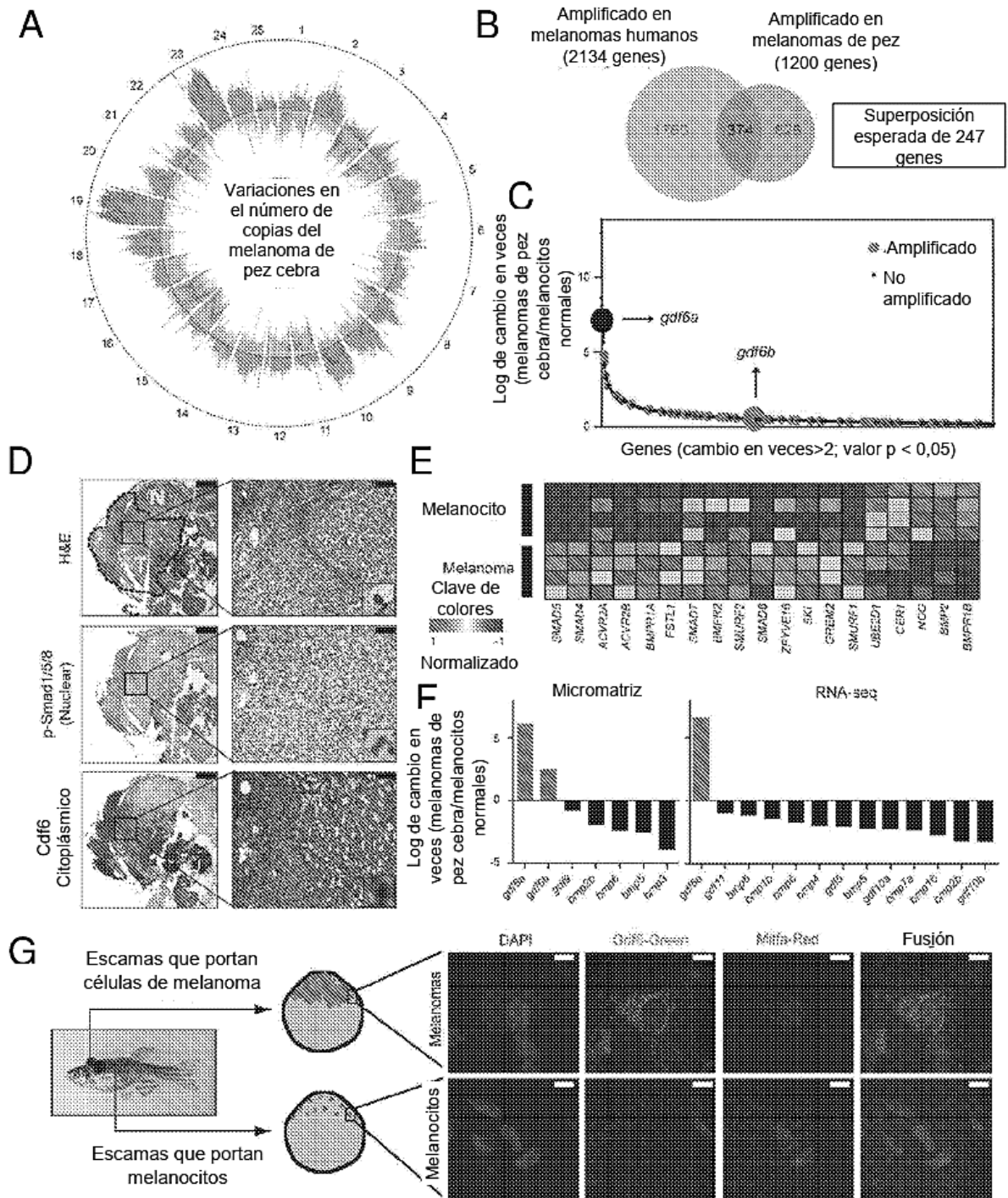
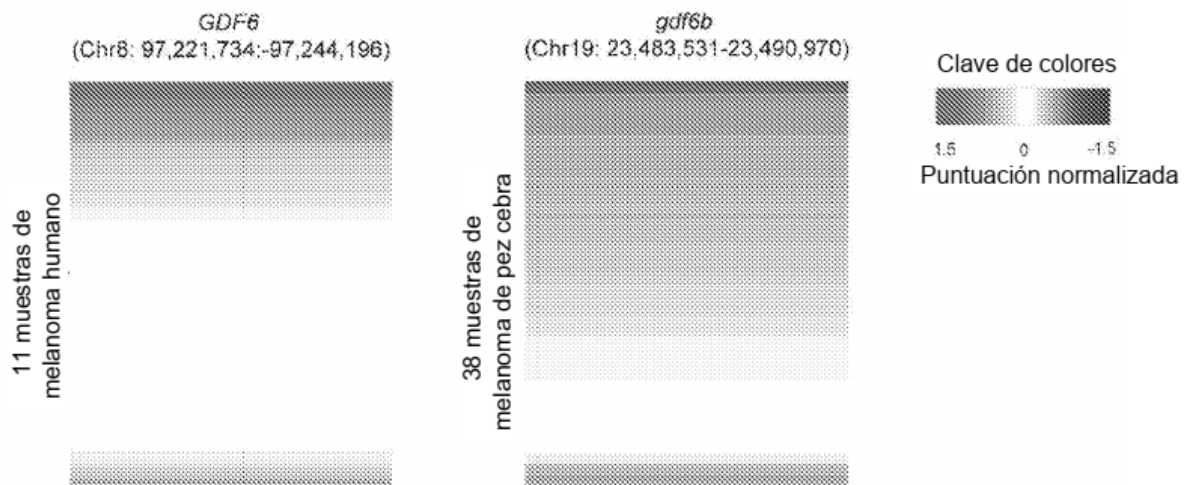


Figura 19

H



I

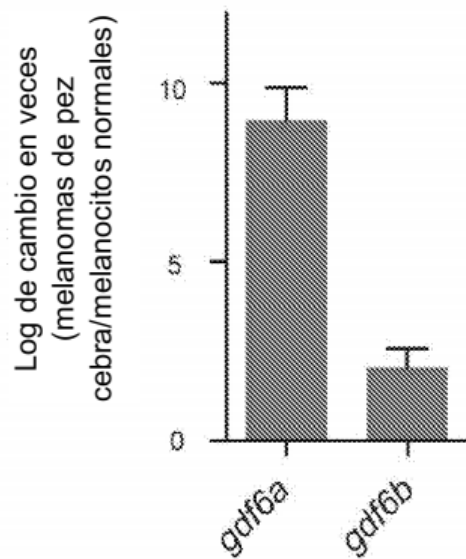


Figura 19 (continuación)

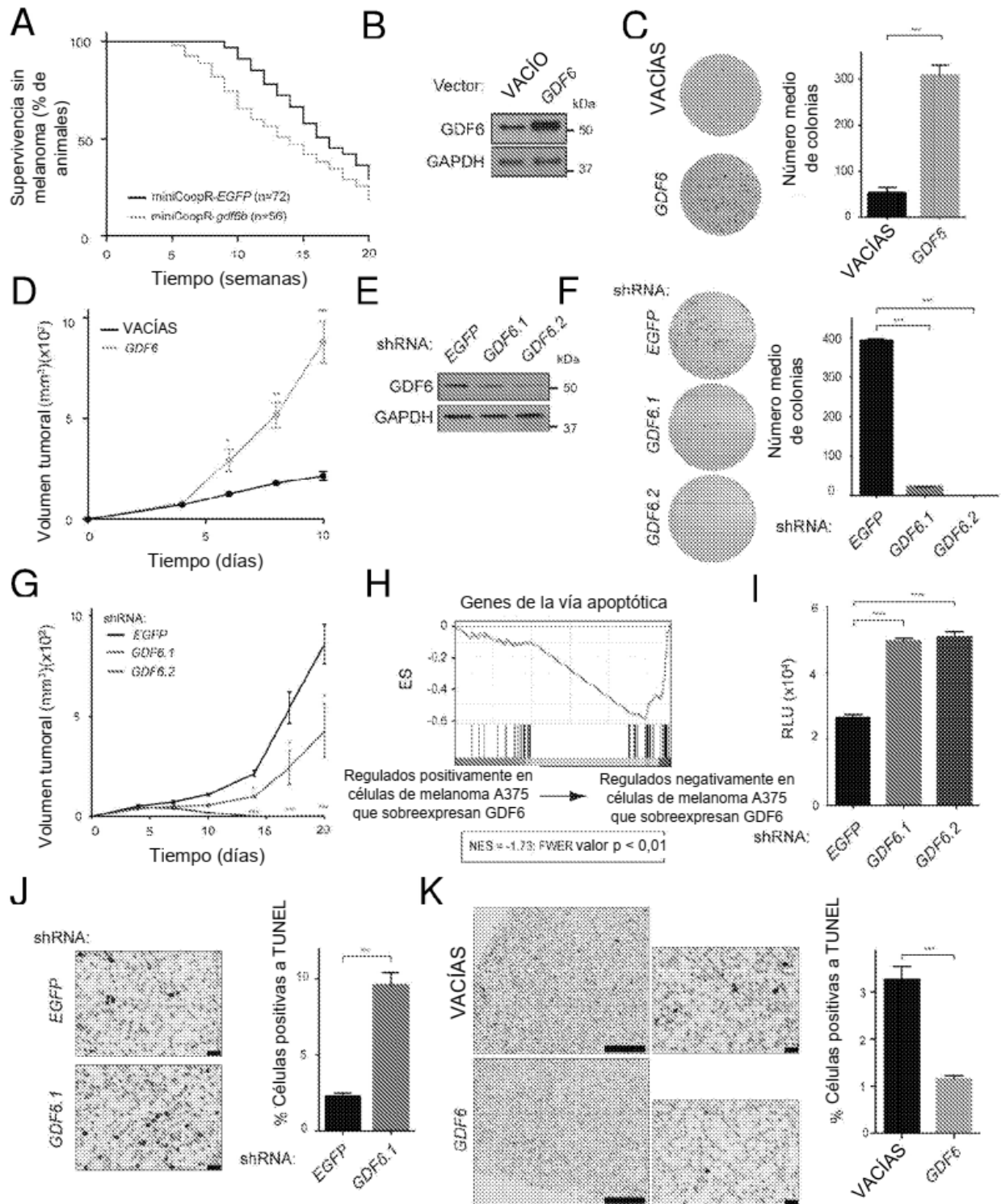


Figura 20

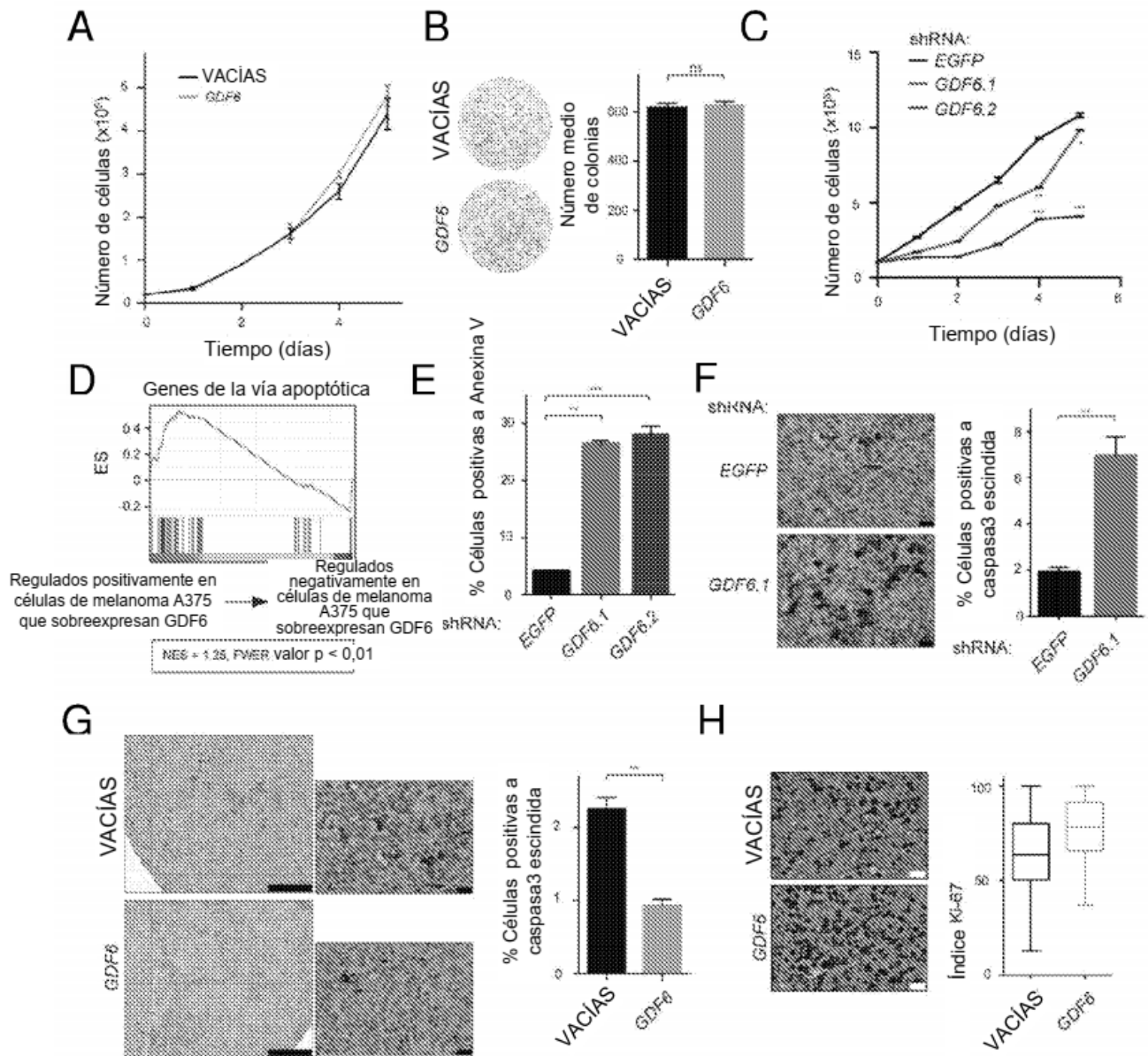


Figura 21

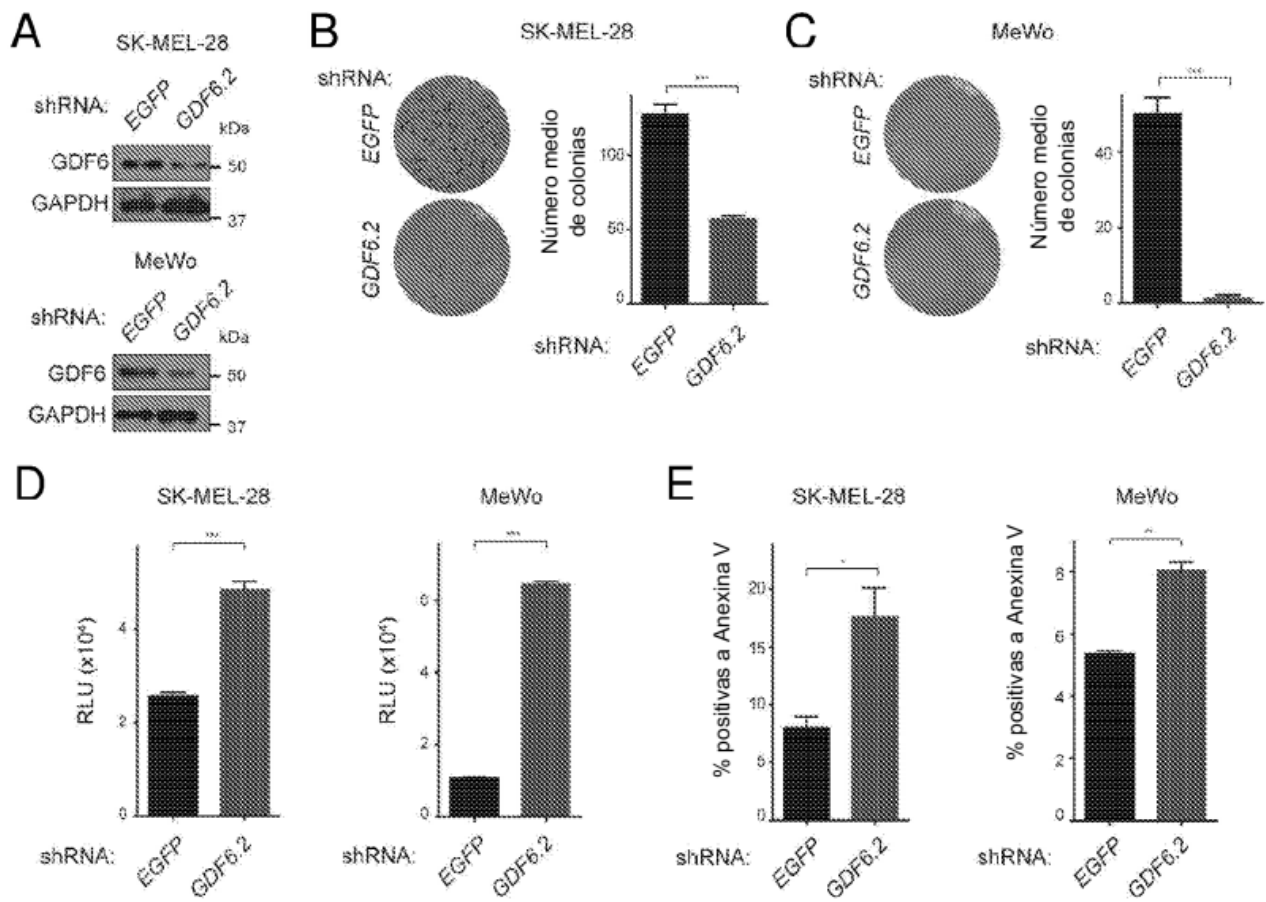


Figura 22

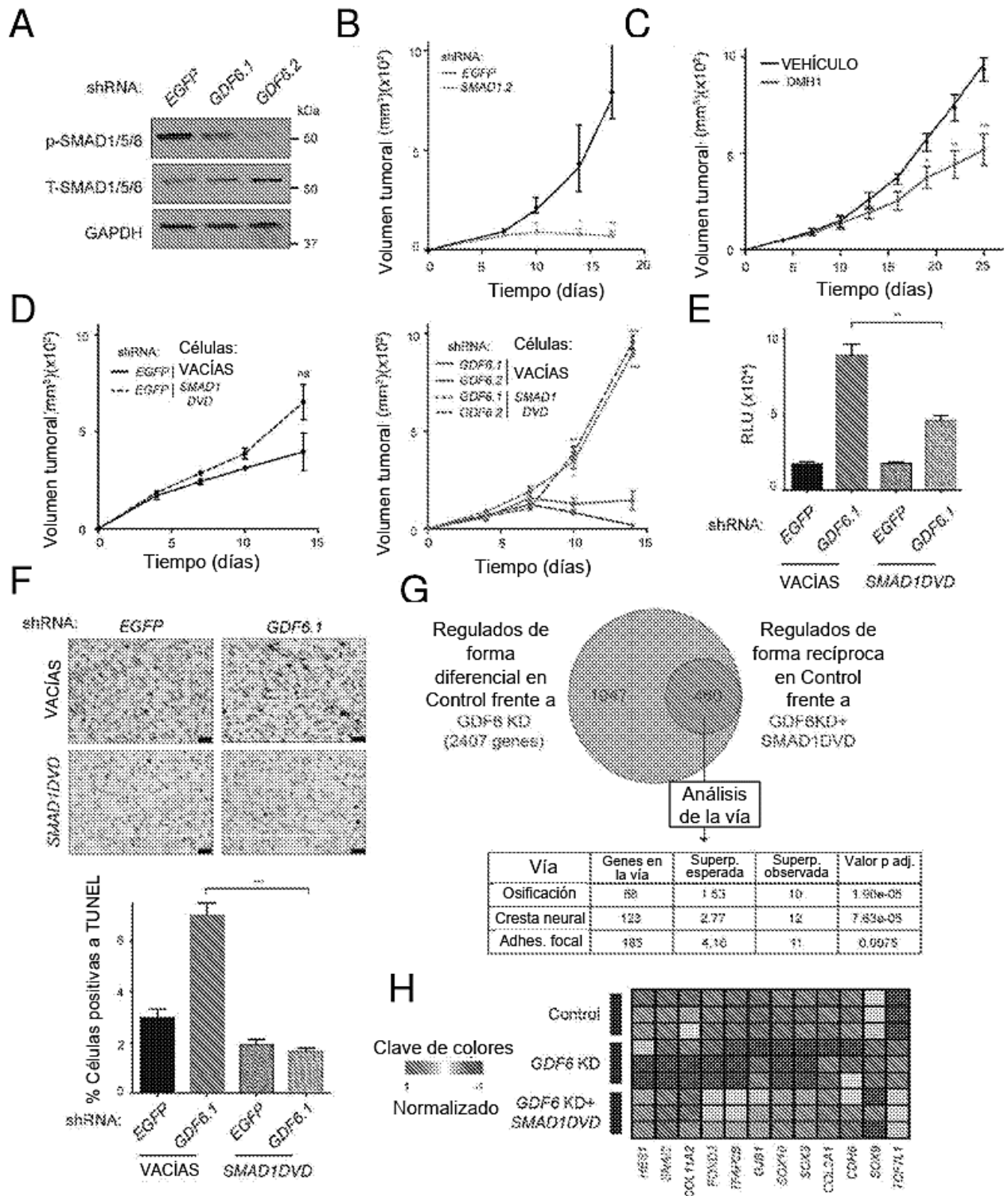


Figura 23

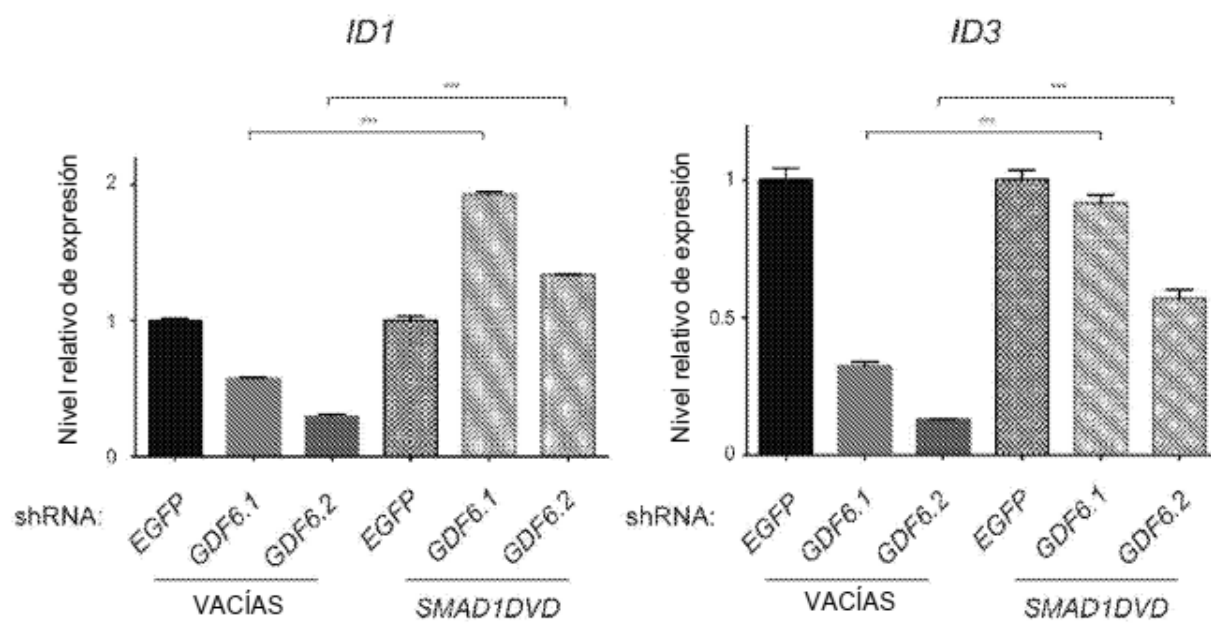


Figura 24

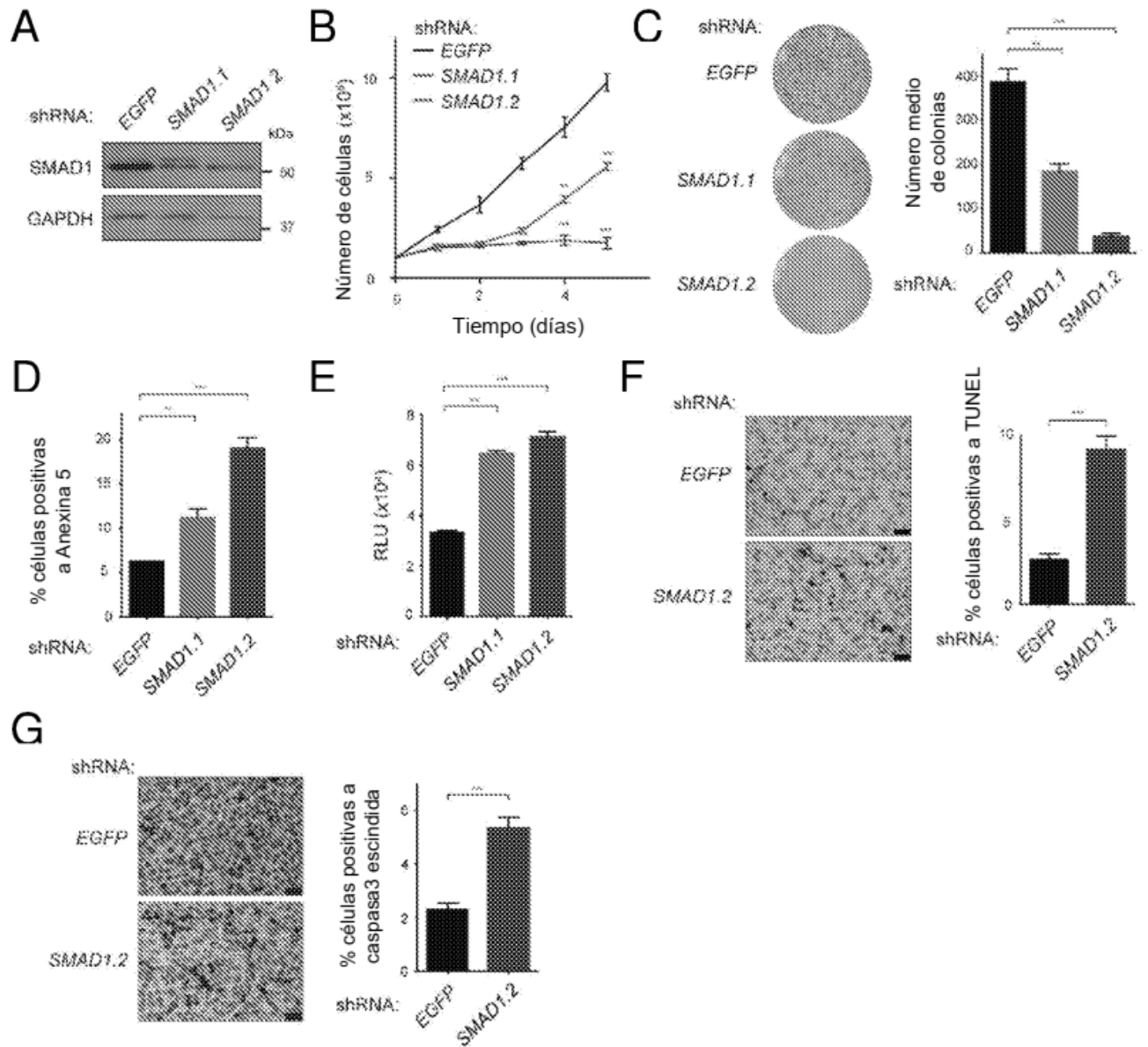


Figura 25

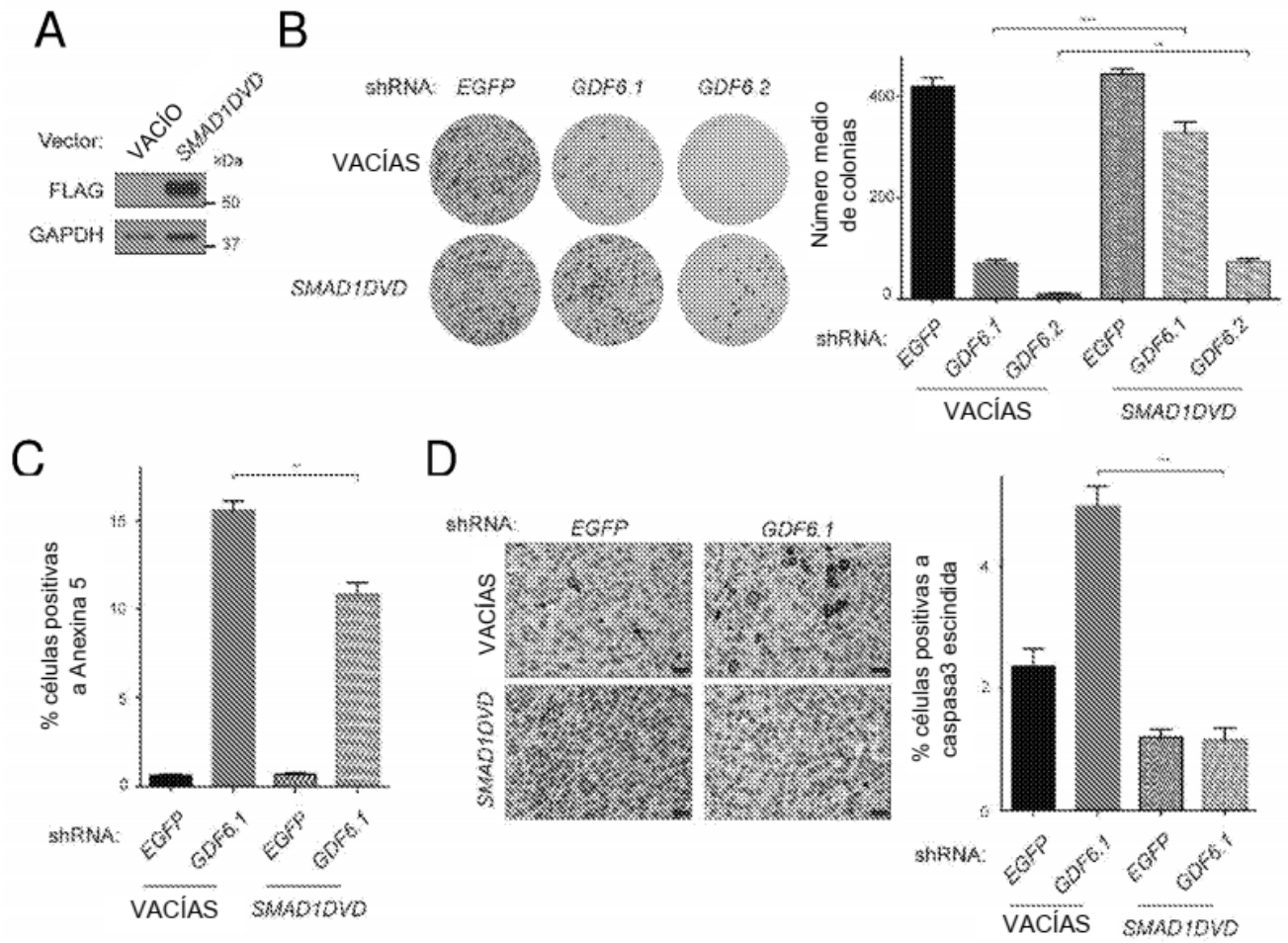


Figura 26

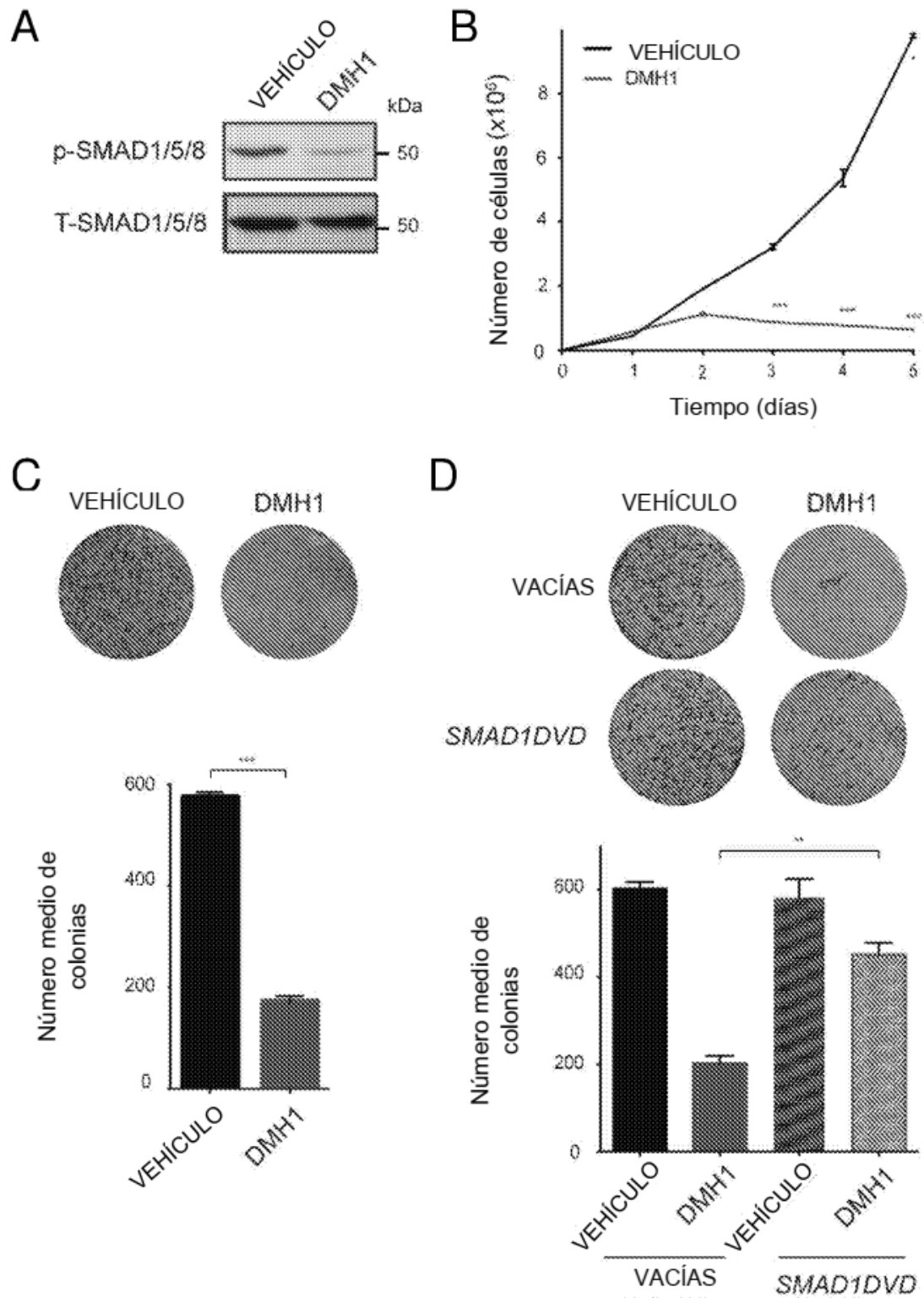


Figura 27

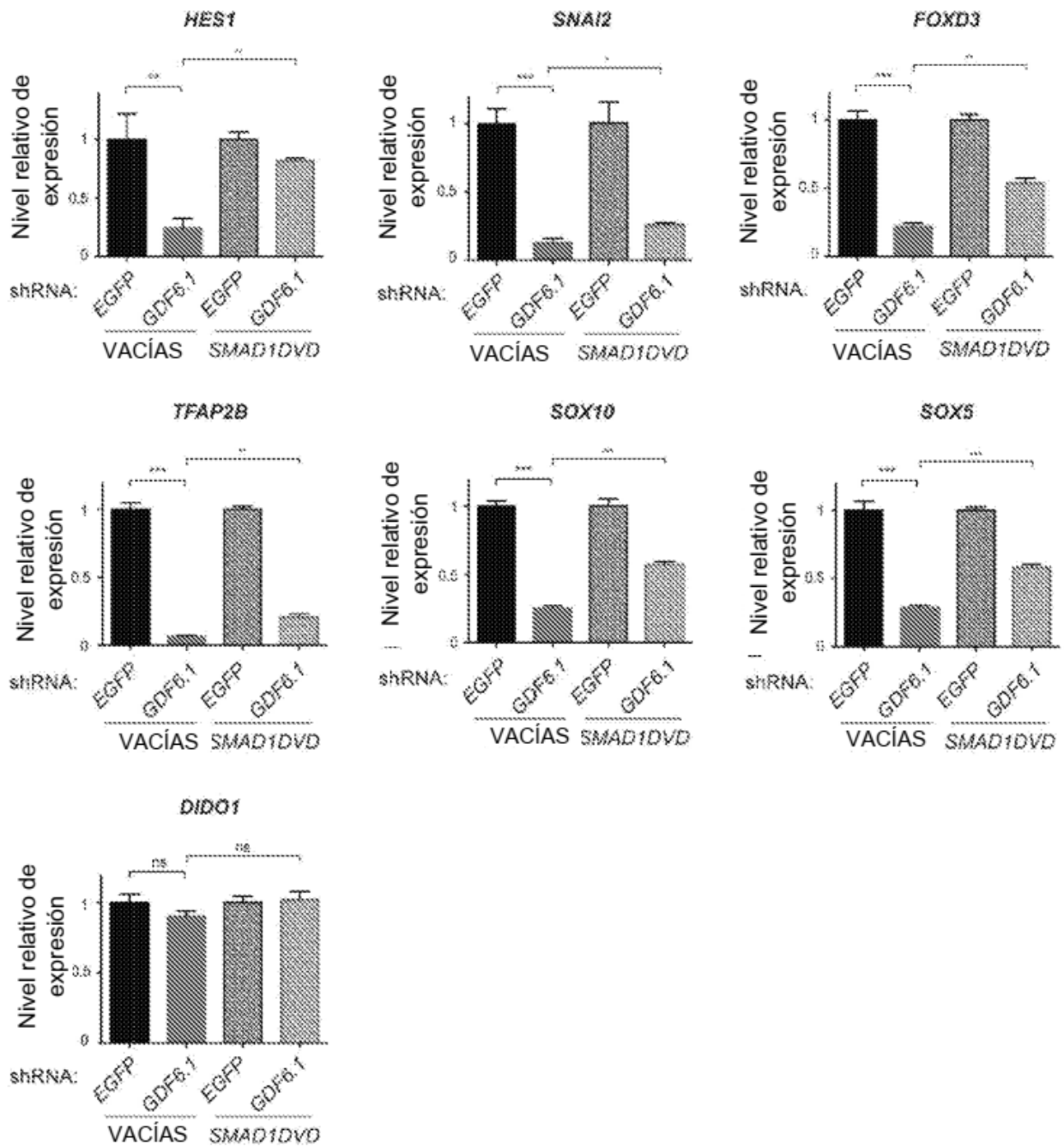


Figura 28

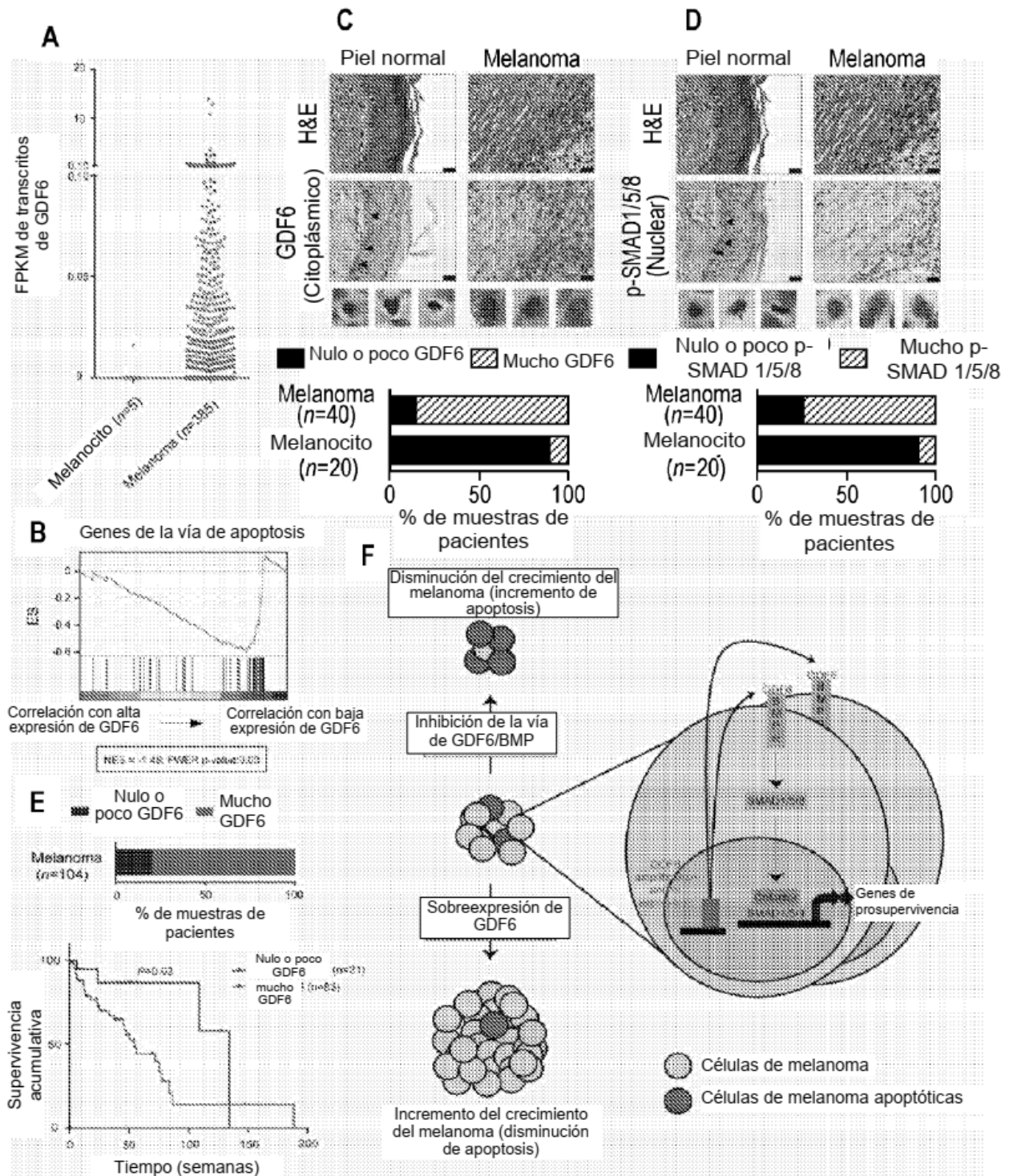


Figura 29

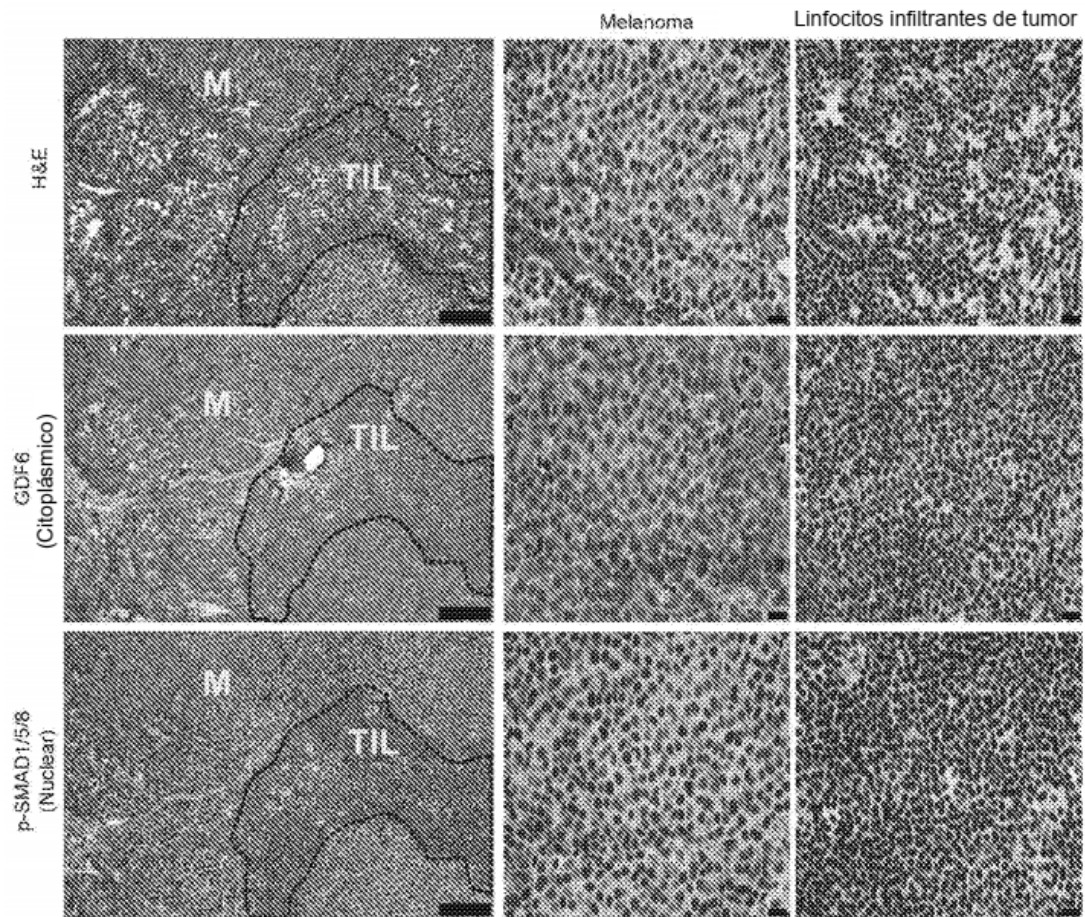


Figura 30