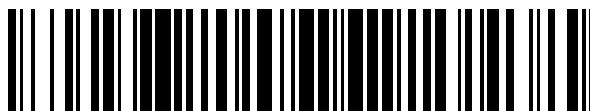


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 778**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2013 E 13151022 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2755027**

54 Título: **Moduladores de la interacción de astrina y raptor, y usos de los mismos en la terapia del cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.11.2016**

73 Titular/es:  
**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG  
(100.0%)  
Fahnenbergplatz  
79085 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:  
**THEDIECK, KATHRIN y  
HOLZWARTH, BIRGIT**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 588 778 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

Moduladores de la interacción de astrina y raptor, y usos de los mismos en la terapia del cáncer

La presente invención se refiere a moduladores de la interacción de astrina y raptor, y a sus usos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con mTOR, tales como el cáncer.

## 5 Descripción

El descubrimiento de la rapamicina de una muestra de tierra en la Isla de Pascua a mediados de los años 60 marcó el comienzo de un campo de investigación excitante en la biología celular y la medicina. Aunque se usó por primera vez como antifúngico y como fármaco inmunosupresor, estudios más recientes confirmaron las propiedades antiproliferativas de la rapamicina con respecto a una variedad de tumores sólidos. La investigación que pretende identificar su mecanismo de acción no cubrió mTOR (diana de mamífero de rapamicina), una proteína cinasa que regula la traducción de ARNm y la síntesis de proteínas, una etapa esencial en la división y proliferación celular. mTOR es parte de la vía de PI3K/AKT/mTOR, una vía de señalización intracelular importante en la apoptosis y, por tanto, el cáncer, por ejemplo, cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas. La activación de PI3K activa AKT, que activa mTOR. En muchos cánceres esta vía es hiperactiva, reduciendo la apoptosis y permitiendo la proliferación. Así, algunos fármacos experimentales para el cáncer tienen como objetivo inhibir la secuencia de señalización en algún punto, y se persiguen varias terapias contra el cáncer basadas en la inhibición de mTOR.

Como ejemplo, Zagouri et al. (en: Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Filipits M, Bartsch R. mTOR inhibitors in breast cancer: A systematic review. *Gynecol Oncol.* 2012 Sep 8) describen la vía de PI3K/AKT/mTOR como un mediador crucial de la progresión tumoral. LoRusso PM. Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment. *Oncology.* 2013;84(1):43-56. Epub 2012 Oct 30 describe que varios agentes que son diana de la vía de mTOR han mostrado potentes efectos antitumorígenicos *in vitro*, y varios agentes también son prometedores en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, tales como everolimus y temsirolimus. Como la vía de PI3K/Akt está muy desregulada en cáncer de mama, la aplicación de inhibidores de mTOR en pacientes con cáncer de mama parece garantizada. Esta es la primera revisión sistemática según las pautas de PRISMA para sintetizar todos los datos disponibles de inhibidores de mTOR en todas las subcategorías de cáncer de mama. La estrategia de búsqueda recuperó 16 estudios que evaluaron everolimus (1492 pacientes), siete estudios que evaluaron temsirolimus (1245 pacientes), un estudio que evaluó sirolimus (400 pacientes) y dos estudios que evaluaron MKC-1 (60 pacientes). El estudio Ensayos de cáncer de mama de everolimus-2 oral (BOLERO-2) ha marcado un punto de inflexión en la evaluación de everolimus en el tratamiento de cáncer de mama positivo para receptores de estrógenos. Dados los resultados positivos, el everolimus ha entrado en las pautas del NCCN 2012, y la autorización de su combinación con exemestano por la FDA y EMA es inminente. Además, la prometedora actividad antitumoral y el control de la enfermedad a largo plazo sugieren adicionalmente que la inhibición de mTOR con everolimus puede proporcionar una vía para lograr el beneficio a largo plazo de la terapia basada en trastuzumab en pacientes positivos para HER2. Con respecto al temsirolimus, parece que el agente puede desempeñar, en el futuro, una función en el tratamiento de cáncer de mama metastásico; y, lo que es más importante, sin embargo, hay una necesidad sin satisfacer de encontrar su subpoblación diana óptima. Los inhibidores de mTOR actualmente en estudios clínicos para enfermedades tumorales y metabólicas también se describen en Inoki et al. (Inoki, K., Kim, J. y Guan, K.L. (2012). AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52, 381-400).

El complejo 1 de mTOR (mTORC1) también comprende la proteína raptor (proteína asociada reguladora de mTOR). mTOR controla el crecimiento celular, regulando en parte la p70 S6 cinasa alfa (p70alfa) y la proteína de unión 1 al factor de iniciación eucariota 4E (4EBP1). Raptor es un andamiaje esencial para la fosforilación catalizada por mTOR de 4EBP1 y media en la acción de TOR *in vivo*.

Kapoor et al. (en: Kapoor V, Zaharieva MM, Das SN, Berger MR. Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt-mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2012 Jun 1;319(1):39-48. Epub 2011 Dec 24) describen la investigación de la actividad anticancerígena de erufosina en líneas celulares de carcinoma escamoso oral en términos de proliferación celular, formación de colonias, inducción de autofagia/apoptosis, ciclo celular y vía de señalización de mTOR. La erufosina mostró citotoxicidad dependiente de la dosis en todas las líneas celulares, indujo autofagia, además de apoptosis, detención del ciclo celular G2 y modulación de la expresión de ciclina D1. Adicionalmente, la erufosina reguló por disminución la fosforilación de componentes importantes de la vía de mTOR, como p-Akt en los residuos Ser473 y Thr308, p-raptor, p-mTOR, p-PRAS40 y sus sustratos aguas abajo de p-p70S6K y p-4EBP1 de un modo dependiente de la dosis. El pretratamiento de células tumorales con ARNip de p-mTOR aumentó los efectos citotóxicos de la erufosina comparables a los del cisplatino, pero superiores a los de la rapamicina.

La proteína astrina (también designada spag5) se ha descrito previamente como proteína asociada al huso que participa en la progresión mitótica (Thein KH, Kleylein-Sohn J, Nigg EA, Gruneberg U. Astrin is required for the maintenance of sister chromatid cohesion and centrosome integrity. *J Cell Biol.* 2007 Jul 30;178(3):345-54). La localización dual de la astrina con respecto a tanto los centrosomas como los cinetocoros indica que puede ser

requerida para la formación del huso como la segregación de cromosomas. La astrina comprende secuencias de ARNm 5'TOP, una característica compartida por muchos factores de la traducción regulados por mTOR.

5 Väik et al (en Väik K, Vooder T, Kolde R, Reintam MA, Petzold C, Vilo J, Metspalu A, Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers. *Oncology*. 2010;79(3-4):283-92. Epub 2011 Mar 16) describen la regulación por incremento de la expresión de SPAG5 en cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Abdel-Fatah T. et al (en A study of Sperm-associated Antigen 5 (SPAG5) in predicting response to Anthracycline (ATC)/Platinum Chemotherapies (CT) in breast (BC) & Ovarian Cancers (OVC) *Virchows Arch* (2012) 461 (Suppl 1):S1-S332) describen SPAG5 como un gen novedoso implicado en la supervivencia de células BC y OVC y su expresión de proteínas es un factor predisponente independiente para antraciclina/cisplatino CT.

10 Cheng et al. "Glycogen Synthase Kinase 3 Interacts with and Phosphorylates the Spindle-associated Protein Astrin", *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 4, 26 de noviembre de 2007, páginas 2454-2464; Yang et al. "Silencing of astrin induces the p53-dependent apoptosis by suppression of HPV18 E6 expression and sensitizes cells to paclitaxel treatment in HeLa cells", *Biochem Biophys Res Comm*, vol. 343, no. 2, 5 de mayo de 2006, páginas 428-434; y Du et al. "Astrin regulates Aurora-A localization", *Biochem Biophys Res Comm*, vol. 370, no. 2, 30 de mayo de 2008, páginas 213-219, definen ampliamente métodos y compuestos para inhibir, entre otros, la astrina, y desvelan herramientas de cribado para la identificación de antagonistas de astrina (iARN) y la idoneidad de estos antagonistas para productos farmacéuticos.

20 A pesar de los enfoques anteriores, se desean nuevas dianas para la terapia del cáncer, en particular en el contexto de funciones celulares mediadas directa o indirectamente por el complejo 1 de mTOR. Es, por tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar estas nuevas dianas y emplear estas dianas en el desarrollo de nuevas y eficaces terapias para el cáncer. Otros objetivos y aspectos de la presente invención serán evidentes para el experto tras la lectura de la siguiente descripción de la invención.

25 Según un primer aspecto de la misma, el objetivo de la presente invención se resuelve proporcionando un método de identificación de un compuesto que modula la interacción de astrina con raptor en una célula, que comprende las etapas de a) poner en contacto al menos uno de astrina, un fragmento de unión a raptor de astrina y/o una célula que expresa astrina o un fragmento de unión a raptor de la misma con al menos un compuesto que posiblemente modula la interacción de astrina con raptor en una célula, y b) identificar una modulación de la unión de astrina o dicho fragmento a raptor en presencia de dicho al menos un compuesto.

30 Se encontró sorprendentemente por los presentes inventores que la astrina proporciona una valiosa herramienta para enfoques terapéuticos con el fin de tratar o prevenir el cáncer, ya que la progresión del ciclo celular defectuosa en células deficientes en astrina podría limitar la idoneidad de la astrina como diana terapéutica. Sin embargo, los ratones deficientes en astrina (Xue, J., Tarnasky, H.A., Rancourt, D.E. y van Der Hoorn, F.A. (2002). Targeted disruption of the testicular SPAG5/deepest protein does not affect spermatogenesis or fertility. *Mol Cell Biol* 22, 1993-1997) y ratas (Yagi, M., Takenaka, M., Suzuki, K. y Suzuki, H. (2007). Reduced mitotic activity and increased apoptosis of fetal sertoli cells in rat hypogonadic (hgn/hgn) testes. *J Reprod Dev* 53, 581-589) son viables, sin presentar fenotipos importantes. Así, los inventores encontraron concebible dirigirse a la astrina en enfermedad humana sin afectar las funciones vitales.

40 En el contexto de la presente invención, también debe entenderse que el término "astrina" indica/representa el homólogo de mamífero (en particular ratón) del gen y/o proteína y/o ARNm de astrina humana. Por tanto, el término debe comprender el polipéptido de astrina completo o fragmento como se describe en el presente documento, tal como el fragmento de unión a raptor. El término también cubre astrina en diferentes preparaciones, tales como en el contexto celular, purificada de la célula, o como parte o asociada a gránulos de estrés, y fracciones de los mismos. Similarmente, también debe entenderse raptor que indica/representa el homólogo de mamífero (en particular ratón) del gen y/o proteína y/o ARNm de raptor humano. Se prefiere un método según la presente invención, en el que  
45 dicha modulación esté seleccionada de una disminución o un aumento de dicha expresión y/o de dicha unión a raptor.

Preferentemente, dicha identificación comprende un método seleccionado de rtPCR, inmunoprecipitación y medición de la inducción o reducción de la apoptosis en dicha célula. Ensayos respectivos son conocidos para el experto.

50 Es más preferido un método según la presente invención, en el que dicho compuesto está seleccionado del grupo que consiste en una biblioteca de péptidos, una biblioteca combinatoria, un extracto celular, en particular un extracto de células de planta, un "fármaco de molécula pequeña", un oligonucleótido antisentido, un ARNip, un ARNm y un anticuerpo o fragmento del mismo, que interfiere específicamente con la unión de astrina a raptor.

Según la invención, dicha célula puede seleccionarse del grupo de células cancerosas, células huésped recombinantes de células madre no embrionarias humanas que expresan astrina o el fragmento de unión a raptor de la misma, en la que dichas células huésped recombinantes expresan opcionalmente raptor, células de levadura y  
55 células bacterianas recombinantes.

Adicionalmente se prefiere un método según la presente invención, en el que dicho fragmento de unión a raptor de astrina comprende el dominio de cabeza del extremo N del polipéptido de astrina, por ejemplo, los aminoácidos 1-481 del extremo N del polipéptido de astrina como se describe en el presente documento, en particular en SEQ ID No. 1.

- 5 El método según la presente invención como se describe en el presente documento es así adecuado para la identificación de compuestos que pueden interactuar con la unión de astrina a raptor, y así para identificar, en particular, inhibidores, competidores o moduladores de la unión de astrina. Se prefieren compuestos que inhiben la unión de astrina a raptor. Otro aspecto se refiere a compuestos que modulan la expresión de astrina en una célula/en células.
- 10 Otro aspecto se refiere a un método según la presente invención, que comprende además probar dicho(s) compuesto(s) como se identifican por su actividad para sensibilizar las células tumorales a la apoptosis. Como la apoptosis se produce mediante una compleja cascada de señalización que está estrechamente regulada en múltiples puntos, hay muchas oportunidades para evaluar la actividad de las proteínas implicadas. Se conciben un gran número de ensayos de apoptosis para detectar y contar células apoptóticas. Los ensayos de apoptosis, basados en la metodología, pueden clasificarse en seis grupos importantes e incluyen ensayos que detectan alteraciones citomorfológicas; fragmentación de ADN; detección de caspasas, sustratos, reguladores e inhibidores escindidos; alteraciones de la membrana; detección de apoptosis en montajes completos; y ensayos mitocondriales. Un ensayo preferido es el ensayo cinético en microcultivo (MiCK). El experto conoce ensayos respectivos, y pueden tomarse de la bibliografía respectiva.
- 20 El término “poner en contacto” en la presente invención significa cualquier interacción entre la(s) sustancia(s) posiblemente de unión con astrina, por lo que cualquiera de los dos componentes pueden estar independientemente entre sí en una fase líquida, por ejemplo, en disolución, o en suspensión o pueden unirse a una fase sólida, por ejemplo, en forma de una superficie esencialmente plana o en forma de partículas, perlas o similares. En una realización preferida, una multitud de sustancias diferentes posiblemente de unión se inmovilizan sobre una superficie sólida como, por ejemplo, sobre un chip de biblioteca de compuestos y la astrina (o una parte funcional de la misma) se pone posteriormente en contacto con un chip tal.
- 25

La astrina empleada en un método de la presente invención puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento con deleciones del extremo N/C y/o internas. Preferentemente, el fragmento es uno que comprende la parte de unión de astrina a raptor y así tanto un fragmento del extremo N como un fragmento del extremo C.

30 Adicionalmente se prefiere un método según la presente invención, en el que dicho fragmento de unión a raptor de astrina comprende el dominio de cabeza del extremo N del polipéptido de astrina, por ejemplo, los aminoácidos 1-481 del extremo N del polipéptido de astrina como se describe en el presente documento, en particular en SEQ ID No. 1.

La sustancia posiblemente de unión, cuya unión a astrina va a medirse, puede ser cualquier sustancia química o cualquier mezcla de las mismas. Por ejemplo, puede ser una sustancia de una biblioteca de péptidos, una biblioteca combinatoria, un extracto celular, en particular un extracto de células de planta, un “fármaco de molécula pequeña”, una proteína y/o un fragmento de proteína.

35

La medición de la unión del compuesto a astrina puede llevarse a cabo tanto midiendo un marcador que puede unirse ya sea a la proteína o al compuesto posiblemente de interacción. Marcadores adecuados son conocidos para algún experto en la materia y comprenden, por ejemplo, marcadores de fluorescencia o radiactivos. La unión de los dos componentes también puede, sin embargo, medirse por el cambio de un parámetro electroquímico del compuesto de unión o de la proteína, por ejemplo, un cambio de las propiedades redox de la astrina o el compuesto de unión, tras la unión. Métodos adecuados de detección de tales cambios comprenden, por ejemplo, métodos potenciométricos. Métodos adicionales de detección y/o medición de la unión de los dos componentes entre sí se conocen en la técnica y también pueden usarse, sin limitación, para medir la unión del posible compuesto que interacciona a astrina o fragmentos de astrina. El efecto de la unión del compuesto o la actividad de la astrina también pueden medirse indirectamente, por ejemplo, ensayando una actividad enzimática de astrina después de la unión.

40

45

Como otra etapa, después de medir la unión de un compuesto posiblemente de interacción y después de haber medido al menos dos compuestos posiblemente de interacción diferentes, puede seleccionarse al menos un compuesto, por ejemplo, basándose en la actividad de unión medida o basándose en el aumento o disminución detectado de actividad de unión y/o expresión de astrina.

50

Así, otro aspecto de la presente invención implica un cribado según la presente invención como se describe en el presente documento, que comprende además un cribado adicional de la interacción de astrina con el componente de gránulos de estrés G3BP1. Dicho cribado puede tanto producirse en presencia como en ausencia de astrina, y en presencia o ausencia de un compuesto que ha sido identificado (preseleccionado) en un primer cribado usando astrina y raptor como se describe en el presente documento.

55

El compuesto de unión así seleccionado se modifica entonces en una realización preferida en otra etapa. La modificación puede efectuarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación, la introducción de cadenas laterales novedosas o el intercambio de grupos funcionales como, por ejemplo, la introducción de halógenos, en particular F, Cl o Br, la introducción de grupos alquilo inferior, que tienen preferentemente uno a cinco átomos de carbono como, por ejemplo, grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo o iso-pentilo, grupos alqueno inferior, que tienen preferentemente dos a cinco átomos de carbono, grupos alquino inferior, que tienen preferentemente dos a cinco átomos de carbono o mediante la introducción de, por ejemplo, un grupo seleccionado del grupo que consiste en grupo NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OH, SH, NH, CN, arilo, heteroarilo, COH o COOH.

Las sustancias de unión así modificadas se prueban entonces individualmente con un método de la presente invención, es decir, se ponen en contacto con astrina y se mide la unión posterior de los compuestos modificados al polipéptido de astrina. En esta etapa, puede medirse ya sea la unión por sí misma y/o puede medirse el efecto de la función de la astrina como, por ejemplo, la unión a raptor y/o la actividad enzimática del polipéptido. Si se necesitan, las etapas de seleccionar el compuesto de unión, modificar el compuesto de unión, poner en contacto el compuesto de unión con un polipéptido de astrina y medir la unión de los compuestos modificados a la proteína pueden repetirse una tercera o cualquier número dado de veces según se requiera. El método anteriormente descrito también se llama "evolución dirigida", ya que implica una multitud de etapas que incluyen modificación y selección, por lo que los compuestos de unión están seleccionados en un proceso "evolutivo" que optimiza sus capacidades con respecto a una propiedad particular, por ejemplo, su actividad de unión, su capacidad para activar o modular la actividad del polipéptido de astrina.

En vista de lo anterior, posibles aplicaciones de la presente invención para los seres humanos incluyen:

a) Enfoques de diagnóstico: Como la actividad de astrina está asociada a raptor y así el complejo 1 de mTOR, pueden desarrollarse pruebas genéticas para evaluar un riesgo individual en relación con cáncer basado en la unión, actividad y/o expresión de astrina, en particular con el fin de desarrollar un plan de tratamiento personalizado.

b) Enfoques farmacéuticos (cáncer) y terapéuticos: Los datos de los inventores indican que una inhibición de la acción de astrina puede usarse como fármaco que previene, trata y/o ralentiza la evolución del cáncer en mamíferos/seres humanos. Una construcción de inhibidor/inhibidora de la unión de astrina también puede usarse como fármaco para el cáncer.

La vía de astrina/raptor define una vía novedosa con dianas aguas abajo posiblemente valiosas que regulan la división celular y la apoptosis y/u otras entidades biológicas hasta ahora desconocidas.

El término "homología", como se usa en el presente documento, debe significar un valor obtenido por una búsqueda con BLAST [Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, (1990)]. La homología en la secuencia de aminoácidos puede calcularse por un algoritmo de búsqueda BLAST. Más particularmente, puede calcularse usando un programa b12seq (Tatiana A. Tatusova y Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) en un paquete BLAST (edición sgi32bit, versión 2.0.12; obtenido de NCBI) según un parámetro por defecto. Como parámetro de alineamiento por pares se usa un programa "blastp". Además, se usan, respectivamente, "0" como valor de coste de inserción de hueco, "0" como valor de coste del alargamiento de hueco, "SEG" como filtro para una secuencia de búsqueda y "BLOSUM62" como matriz.

Según otro aspecto de la misma, el objetivo de la presente invención se resuelve proporcionando el uso de una herramienta de cribado para cribar un compuesto que modula la interacción de astrina con raptor en una célula, que comprende una célula aislada que expresa astrina, y/o que expresa un fragmento de unión a raptor de la misma, en el que dicha célula opcionalmente expresa raptor y/o un fragmento de unión de astrina de la misma, y en el que dicha célula no es una célula madre embrionaria humana. La célula puede ser una célula procariota o eucariota, y las construcciones de expresión pueden estar presentes extracromosómicamente y o integradas dentro del cromosoma. Los polipéptidos pueden expresarse en forma de una proteína de fusión, por ejemplo, junto con un resto enzimáticamente activo como construcción de indicador, con el fin de ser capaz de detectar el producto de expresión. Células huésped preferidas se derivan de células seleccionadas de músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, corazón, páncreas, riñón, tejido de mama, tejido de ovario y/o hipotálamo. Así, se prefiere el uso de una herramienta de cribado según la presente invención,

en la que dicha célula está seleccionada del grupo de células cancerosas, células huésped recombinantes que expresan astrina o el fragmento de unión a raptor de la misma, células de levadura y células bacterianas recombinantes, en la que dicha célula recombinante expresa opcionalmente raptor y/o un fragmento de unión de astrina del mismo. Adicionalmente, se prefiere un método según la presente invención, en el que dicho fragmento de unión a raptor de astrina comprende el dominio de cabeza del extremo N del polipéptido de astrina, por ejemplo, los aminoácidos 1-481 del extremo N del polipéptido de astrina como se describe en el presente documento, en particular en SEQ ID No. 1.

Se describe el uso de una herramienta de cribado para un agente para tratar o prevenir cáncer, en particular una herramienta de cribado para cribar un compuesto que modula la expresión, la actividad biológica y/o la interacción de astrina con raptor en una célula, en el que dicha célula como antes es parte de un mamífero transgénico no humano, que preferentemente expresa en exceso astrina y/o raptor opcionalmente como una construcción de indicador genética. Se prefiere un ratón, rata, cerdo, cabra u oveja transgénico, en el que la construcción de indicador se expresa preferentemente en células seleccionadas de músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, corazón, páncreas, riñón y/o hipotálamo de dicho animal. Métodos de producción de este mamífero transgénico no humano que expresa en exceso astrina y/o raptor y/o que lleva una construcción de indicador genética de astrina y/o raptor son muy conocidos para el experto en la materia. También se prefieren mamíferos no humanos transgénicos en los que el gen que es homólogo a astrina/raptor se intercambia por un gen que tiene una función modificada (por ejemplo, animal con genes inactivados o activados).

Similar a las estrategias para identificar compuestos que interactúan con astrina y la unión de la misma a raptor, y/o la actividad biológica de la astrina, pueden identificarse compuestos que modulan la expresión de astrina en una célula. En estrategias preferidas, la expresión de astrina puede monitorizarse usando una construcción de indicador genética para astrina (con el fin de analizar la eficiencia de la traducción y/o la estabilidad del polipéptido de astrina), para un ejemplo puede medirse una proteína de fusión que comprende un miembro de fusión detectable (tal como un grupo enzimático o fluoróforo, o GFP como se describe en el presente documento), o la cantidad de ARNm como está presente en una célula, por ejemplo, por transferencia Northern. La expresión también puede analizarse y monitorizarse usando análisis de chip o rtPCR. Los compuestos preferidos que modulan la expresión de astrina en una célula están seleccionados de oligonucleótidos antisentido específicos, ARNip, ARNm u otros ácidos nucleicos preferentemente mutados que codifican astrina. Estos elementos genéticos pueden usarse con el fin de proporcionar/mantener la pérdida de función (por ejemplo, por las truncaciones que se identifican) de astrina, o la unión a raptor de la misma, en dicha célula. Otra realización preferida es la transferencia de dichos elementos genéticos usando terapia génica. Además, están englobadas construcciones virales para la introducción de dichos elementos genéticos dentro de dichas células. Alternativamente, también el ácido nucleico "desnudo" puede introducirse en la(s) célula(s), por ejemplo, usando tecnologías mediadas por partículas. Métodos respectivos se describen bien en la bibliografía y son conocidos para el experto.

Adicionalmente se prefiere el uso de herramienta de cribado según la presente invención como se describe en el presente documento,

en la que dicha astrina y/o raptor y/o los fragmentos de los mismos se marcan. Marcas y métodos de marcado son conocidos para el experto, y pueden ser marcas enzimáticas, colorantes, fluoróforos y/o marcas radiactivas.

Se describe el uso de las herramientas como se describe en el presente documento para cribar un compuesto que modula la expresión, la actividad biológica y/o la interacción de astrina con raptor en una célula como se describe en el presente documento. Se prefiere un uso, en el que dicha herramienta es un fragmento de unión a raptor de astrina que comprende el dominio de cabeza del extremo N del polipéptido de astrina, por ejemplo, los aminoácidos 1-481 del extremo N del polipéptido de astrina como se describe en el presente documento, en particular en SEQ ID No. 1. También se describe un método para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir cáncer, que comprende las etapas de: realizar un método de cribado, y formular dicho compuesto como se criba e identifica dentro de una composición farmacéutica.

El compuesto de interacción identificado como se explica resumidamente anteriormente, que puede o puede no haber pasado por rondas adicionales de modificación y selección, se mezcla con sustancias auxiliares y/o aditivos adecuados. Tales sustancias comprenden sustancias farmacológicas aceptables, que aumentan la estabilidad, solubilidad, biocompatibilidad o semivida biológica del compuesto de interacción, o comprenden sustancias o materiales que tienen que incluirse para ciertas vías de administración como, por ejemplo, solución intravenosa, esprays, tiritas o píldoras.

Vehículos, excipientes y estrategias para formular una composición farmacéutica, por ejemplo, que va a administrarse por vía sistémica o tópica, por cualquier vía convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo, por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, por vía parenteral, por ejemplo, en forma de soluciones inyectables o suspensiones, por vía tópica, por ejemplo, en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, o en forma nasal o de supositorio son muy conocidos para el experto y se describen en la bibliografía respectiva.

La administración de un agente, por ejemplo, un compuesto, puede llevarse a cabo por cualquier método que permita al agente llegar a las células diana. Estos métodos incluyen, por ejemplo, inyección, deposición, implantación, supositorios, ingestión oral, inhalación, administración tópica, o cualquier otro método de administración en el que se obtiene el acceso a las células diana por el agente. Las inyecciones pueden ser, por ejemplo, intravenosas, intradérmicas, subcutáneas, intramusculares o intraperitoneales. La implantación incluye insertar sistemas de administración de fármacos implantables, por ejemplo, microesferas, hidrogeles, depósitos poliméricos, matrices de colesterol, sistemas poliméricos, por ejemplo, sistemas de erosión y/o difusión de matrices y sistemas no poliméricos, por ejemplo, pellas comprimidas, fusionadas o parcialmente fusionadas. Los supositorios incluyen supositorios de glicerina. La dosis de ingestión oral puede estar entéricamente recubierta. La inhalación incluye administrar el agente con un aerosol en un inhalador, tanto solo como unido a un vehículo que puede

absorberse. El agente puede suspenderse en líquido, por ejemplo, en forma disuelta o coloidal. El líquido puede ser un disolvente, disolvente parcial o no disolvente. En muchos casos puede usarse agua o un líquido orgánico.

Se describe una composición farmacéutica para tratar o prevenir cáncer, obtenible por un método según el método de antes.

- 5 En ciertas realizaciones, el compuesto (inhibidor) se administra al sujeto administrando un ácido nucleico recombinante, tal como, por ejemplo, un ARN anti-astrina, por ejemplo, un ARNip. Preferentemente, el ácido nucleico recombinante es un vector de terapia génica.

10 Otro aspecto se refiere a un método o uso como se describe en el presente documento, en el que la composición farmacéutica comprende además principios farmacéuticamente activos adicionales para tratar cáncer, es decir, quimioterapéuticos, tales como, por ejemplo, rapamicina.

15 Se describe un método de tratamiento o prevención de cáncer en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica según la invención como antes. En general, el médico adjunto se basará en un tratamiento en el compuesto como se identificó, y opcionalmente también en otros datos de pacientes individuales (datos clínicos, historia familiar, ADN, etc.), y también puede realizarse un tratamiento basándose en la combinación de estos factores. Este método, por ejemplo, implica integrar datos de cáncer de diagnóstico individuales con información clínica del paciente y estadística sanitaria general para permitir, por ejemplo, la aplicación de medicina personalizada al paciente. También puede usarse información significativa sobre la eficacia del fármaco, interacciones de fármacos y otras condiciones del estado del paciente.

Se describe un método terapéutico, en el que dicho mamífero que va a tratarse es un ratón, rata o ser humano.

- 20 Más preferentemente, el cáncer que va a tratarse es un tumor sólido, tal como, por ejemplo, seleccionado de cáncer de mama, hueso, ovario, hígado, riñón y de pulmón.

25 Preferentemente, se administra un agente activo inhibidor en forma de una composición farmacéutica, tal como un anticuerpo, nucleótido o un compuesto de unión inactivante para la unión de astrina/raptor. Preferentemente, dicho paciente es un ser humano. Se indica que el tratamiento incluye, por ejemplo, la prevención, tratamiento, reducción de los síntomas de, o cura de la enfermedad o afección, es decir, cáncer.

Se describe el uso de un modulador de la unión de astrina a raptor, y/o la expresión y/o la actividad biológica de astrina, en una célula para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir cáncer. Se prefiere un uso como se describe, en el que dicho modulador es un inhibidor de la unión de astrina a raptor y/o la expresión y/o actividad biológica de astrina.

- 30 Se describe un anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo (tal como, por ejemplo, un fragmento scFv o Fab) que reconoce e interacciona específicamente con la unión de astrina a raptor. Preferentemente, dicho anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo interfiere (tal como inhibe) con la unión de astrina a raptor. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos también pueden marcarse (véase anteriormente), y/o llevar un grupo terapéutico unido a ellos, tal como, por ejemplo, para la terapia con profármaco de enzima dirigida a anticuerpos (ADEPT) o radioinmunoterapia (RIT).
- 35

40 Una "cantidad eficaz" es una cantidad del (de los) compuesto(s) o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento que reduce la expresión y/o abundancia de astrina, o inhibe y/o reduce la unión de astrina a raptor. La cantidad alivia síntomas como se encuentran para el cáncer. Se indica que el alivio incluye, por ejemplo, prevenir, tratar, reducir los síntomas de, o curar la enfermedad (cáncer) o afección (por ejemplo, tamaño del tumor y/o metástasis).

45 Se describe un método de tratamiento de un sujeto en riesgo de cáncer, en el que se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador como antes. El estar en riesgo de la enfermedad puede resultar de, por ejemplo, una historia familiar de la enfermedad, un genotipo que predispone a la enfermedad, o síntomas fenotípicos que predisponen a la enfermedad. Se describe el uso de un modulador de la expresión y/o la actividad biológica de astrina, y/o la unión de astrina a raptor en una célula para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir cáncer. Preferentemente, dicho modulador es un inhibidor de la expresión y/o actividad biológica y/o la unión de astrina a raptor como se describe en el presente documento.

50 Como se ha mencionado anteriormente, la diana de mamífero de la cinasa rapamicina (mTOR) es un regulador central del crecimiento y metabolismo celular (Polak, P. y Hall, M.N. (2009). mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 21, 209-218). mTOR se desregula en un gran número de tumores y trastornos relacionados con la edad (Laplante, M. y Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274-293), e inhibidores de mTOR están actualmente en estudios clínicos para enfermedades tumorales y metabólicas (Inoki, K., Kim, J. y Guan, K.L. (2012). AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52, 381-400).

mTOR se produce en dos complejos multiproteína distintos, llamados complejo 1 de mTOR (mTORC1) y mTORC2. El control traduccional por mTORC1 se produce a varios niveles, a corto plazo por la regulación de varios factores de iniciación de la traducción que incluyen la proteína de unión a 4E (4E-BP1), y a largo plazo por el control de la traducción de componentes ribosómicos, y por el procesamiento de pre-ARNr (Grznil, M. y Hemmings, B.A. (2012). Translation regulation as a therapeutic target in cancer. *Cancer Res* 72, 3891-3900; Iadevaia, V., Wang, X., Yao, Z., Foster, L.J. y Proud, C.G. (2012a). Evaluation of mTOR-regulated mRNA translation. *Methods Mol Biol* 821, 171-185; Iadevaia, V., Zhang, Z., Jan, E. y Proud, C.G. (2012b). mTOR signaling regulates the processing of pre-rRNA in human cells. *Nucleic Acids Res* 40, 2527-2539; Thedieck, K. y Hall, M.N. (2009). Translational Control by Amino Acids and Energy. En *The Handbook of Cell Signaling*, R.B.a.E. Dennis, ed., pp. 2285-2293).

El estrés oxidativo y ROS inducen a los gránulos de estrés (SG) y cuerpos p (PB), que son estructuras dependientes de microtúbulos altamente dinámicas, que regulan la renovación y la traducción de ARNm y contribuyen a la supervivencia celular (revisado por Thomas et al. (Thomas, M.G., Loschi, M., Desbats, M.A. y Boccaccio, G.L. (2011). RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 23, 324-334; y Anderson, P., y Kedersha, N. (2009b). Stress granules. *Curr Biol* 19, R397-398)). Los SG y los PB son gránulos de ARN evolutivamente conservados. Están en intercambio constante entre sí y comparten varios componentes que incluyen la proteína marcadora de PB y SG p54/DDX6. Los PB son componentes celulares constitutivos, y son sitios de degradación de ARNm mediante miARN, iARN, o degradación mediada por no sentido. A diferencia, los SG son sitios de almacenamiento de ARNm que se forman bajo estrés. La respuesta celular a la temperatura, estrés por nutrientes, estrés oxidativo o irradiación activa varios mecanismos para la represión traduccional, entre ellos la fosforilación e inhibición de eIF2 $\alpha$ -S51, que conduce a la acumulación de ARNm poliadenilado no polisómico y factores de iniciación de la traducción dentro de gránulos de ARN. Estos complejos de ARNm-proteína pueden ensamblarse en SG, junto con componentes de SG de auto-asociación, que incluyen la proteína de unión a ARN asociada a gránulos citotóxicos TIA1, la proteína relacionada con TIA-1 TIAR, y la proteína de unión a RasGAP SH3 G3BP1. En particular, la expresión en exceso de estos últimos componentes es frecuentemente suficiente para inducir SG. Los ARNm en SG se clasifican por la degradación en PB, o se guardan para el reinicio de la traducción tras el alivio del estrés.

Aunque tanto los SG como mTOR están estrechamente conectados al estrés por redox y a la regulación traduccional, no hay evidencia de conexiones entre los dos en mamíferos, y los enlaces moleculares directos siguen siendo imprecisos. En la presente invención, los inventores establecen la astrina como un componente crítico de la señalización de mTORC1, que acopla la actividad de mTORC1 con el ensamblaje de SG y la susceptibilidad a la apoptosis de células cancerosas. Podrían demostrar que la astrina recluta el componente de mTORC1 raptor a SG y disocia el complejo de mTOR-raptor para limitar la activación de mTORC1 tras el desafío metabólico y la inducción de estrés por redox. Además, los datos indican que la astrina media en las funciones de SG antiapoptóticas dependientes de mTORC1. Como la astrina se expresa altamente en células cancerosas, y el estrés por redox inducido por hipoxia es una condición común en tumores, la astrina es una diana prometedora para la intervención terapéutica para controlar la actividad de mTORC1 y sensibilizar células tumorales a la apoptosis.

Las siguientes figuras, secuencias y ejemplos simplemente sirven para ilustrar la invención y no debe interpretarse que limiten el alcance de la invención a las realizaciones particulares de la invención descritas en los ejemplos.

La SEQ ID NO 1 muestra la secuencia de aminoácidos de astrina humana.

La Figura 1 muestra esquemáticamente que la astrina se induce y la NFL se inhibe en líneas celulares de tumores de mama y pulmón agresivos.

La Figura 2 muestra la unión de astrina a raptor.

La Figura 3 muestra que la deficiencia de astrina induce al complejo 1 de mTOR.

La Figura 4 muestra que el arsenito induce estrés y la posterior unión astrina-raptor.

La Figura 5 muestra construcciones de astrina como se usan en el contexto de la presente invención, y para su uso como herramientas de cribado.

La Figura 6 muestra los hallazgos como se usan en el contexto de la presente invención en una visión general.

## Ejemplos

### Procedimientos experimentales

**Construcciones, reactivos, líneas celulares y cultivo de tejido.** Se compró pCMV6-AC-FLAG-astrina (N.º de pedido RC201783) de Origen, Rockville, MD, EE.UU. La secuencia de ADNc de longitud completa de la astrina se transfirió dentro de los siguientes plásmidos según el protocolo del fabricante: pCMV6-AC-GFP, pCMV6-AN-GFP, pCMV6-AN-FLAG, pCMV6-entry. Las transfecciones de ADN se hicieron con JetPEI, PolyPlus, Estrasburgo, Francia, como se describe (Sonntag, A.G., Dalle Pezze, P., Shanley, D.P. y Thedieck, K. (2012). A modelling-experimental approach reveals IRS dependent regulation of AMPK by Insulin. *FEBS J*).



Se hizo transfección de ARNip con Lipofectamine™ 2000, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU., según el protocolo del fabricante. Se obtuvo ARNip de astrina/SPAG5 (N.º de pedido L-006839-00-0005) de Dharmacon Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU. Se han descrito líneas celulares de ARNhp inducible establemente transducido para raptor y TSC2 (Dalle Pezze et al., 2012b). El ARNip de astrina se indujo con ON-TARGET más ARNip SMARTpool (N.º L-006839-00-0005), Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.

Se obtuvo ARNhp de astrina lentiviral (N.º de pedido RHS4740) de Open Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU., como el conjunto génico shRNAmir inducible. Se transdujeron células HeLa  $\alpha$  Kyoto con lentivirus según el protocolo del fabricante (clon A8, ID N.º V2THS\_203559; G9, ID N.º V2THS\_203218; D9, ID N.º V3THS\_361123; H8, ID N.º V3THS\_361121; B1, ID N.º V3THS\_361120). Las secuencias diana para todos los clones de ARNip y ARNhp fueron diferentes.

Se realizaron experimentos en células HeLa  $\alpha$  Kyoto, y las líneas de células de cáncer de mama BT474, MDA-MB-231, MDA-MB-453, T-47D, MCF-7. Se describieron protocolos del cultivo de tejido (Dalle Pezze, P., Sonntag, A.G., Thien, A., Prentzell, M.T., Godel, M., Fischer, S., Neumann-Haefelin, E., Huber, T.B., Baumeister, R., Shanley, D.P., et al. (2012b). A Dynamic Network Model of mTOR Signaling Reveals TSC-Independent mTORC2 Regulation. *Sci Signal* 5, ra25). El cultivo de líneas de células de cáncer de mama T-47D, BT474, MDA-MB-231 y MDA-MB-453 se hizo en los siguientes medios: RPMI (PAA, Pasching, Austria) complementado con insulina 100 nM. Se cultivaron células MCF7 en RPMI (PAA, Pasching, Austria). La inducción de insulina/aa se hizo como se describió (Sonntag et al., 2012). Antes de la inducción de estrés con arsenito 500  $\mu$ M o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM, las células se privaron de alimento durante 16 h en DMEM sin glucosa y suero de ternero fetal (PAA, Pasching, Austria) complementado con 1,5 % de L-glutamina.

Se analizaron los gránulos de estrés después de 30 min de la inducción de estrés. La apoptosis se analizó después de 1-3 horas de la inducción de estrés. Los inhibidores se obtuvieron de Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania y Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.; se disolvieron en DMSO y se aplicaron 30 min antes de todas las pautas de inducción, a las siguientes concentraciones: Rapamicina (100 nM), PP242 (250 nM), wortmanina (200 nM), cicloheximida (2  $\mu$ g/ml); las células HeLa se sincronizaron con nocodazol (400 ng/ml) y posterior sacudida mitótica a G2/M, y se retiró como se describió (Thein, K.H., Kleylein-Sohn, J., Nigg, E.A. y Gruneberg, U. (2007). Astrin is required for the maintenance of sister chromatid cohesion and centrosome integrity. *J Cell Biol* 178, 345-354).

**Espectrometría de masas.** Se realizó la identificación de interactores de mTOR y raptor novedosos como se describió (Thedieck, K., Polak, P., Kim, M.L., Molle, K.D., Cohen, A., Jenó, P., Arriemerlou, C. y Hall, M.N. (2007). PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One* 2, e1217007).

Se describieron la **lisis, IP e inmunotransferencia (IB)** en cualquier parte (Dalle Pezze, P., Sonntag, A.G., Shanley, D.P. y Thedieck, K. (2012a). Response to Comment on "A Dynamic Network Model of mTOR Signaling Reveals TSC-Independent mTORC2 Regulation". *Sci Signal* 5; Dalle Pezze et al., 2012b; Sonntag et al., 2012; Thedieck et al., 2007). Los anticuerpos se describen en cualquier parte (Dalle Pezze et al., 2012b; Sonntag et al., 2012). Otros anticuerpos fueron de Bethyl, Montgomery, TX, EE.UU., contra histona H3 (N.º A300-823A), histona H3-pS10 (N.º A301-844A) y DDX6/p54 (N.º A300-461A); de Cell Signaling Technology Inc., Boston, MA, EE.UU., contra ATF-4 (N.º 11815), hnRNP-A1 (N.º 8443), YB1 (N.º 9744), HSP90 (N.º 4877), HSP70 (N.º 4867), HSF1 (N.º 4356); de Santa Cruz, CA, EE.UU., contra G3BP1 (N.º sc-81940), astrina (N.º sc-98605); y de Abcam, Cambridge, RU, contra Plk1 (N.º ab17056). Todos los anticuerpos se usaron según las instrucciones del fabricante. Se generaron anticuerpos monoclonales para PLA en ratones o ratas para astrina, mTOR y raptor por la Dra. Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München, Instituto de Inmunología Molecular, Marchioninistrasse 25, 81377 München, Alemania. Los péptidos para la producción de anticuerpos se prepararon por Peptide Specialty Laboratories (PSL) GmbH, Heidelberg, Alemania.

**IF, microscopía de fluorescencia y microscopía confocal.** Se realizaron tinciones de IF como se describieron (Thedieck et al., 2007). Se fijaron células durante 5 min con metanol helado a -20 °C. Las células transfectadas con GFP se fijaron con 4 % de paraformaldehído durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizó microscopía de fluorescencia con un microscopio compuesto Axioimager.Z1 con una cámara AxioCam MRm3 CCD; se usó el software Axiovision versión 4.8.1 (Carl Zeiss AG, Alemania) para el análisis de imágenes. Se realizó obtención de imágenes confocales con un microscopio LSM 510 Duo-Live equipado con un objetivo 100x/1,45 NA Plan-Apocromate (ambos de Carl Zeiss). La excitación de los fluoróforos (Hoechst 33342, Alexa-488, Cy3, Cy5) se realizó a 405, 488, 561 y 633 nm, respectivamente. Para la detección de la señal de emisión a intervalos especificados, se usaron canales de fotomultiplicador con filtro BP 420-480, BP 505-530, BP 575-615, LP 650 nm. Los diámetros de apertura confocal siempre se ajustaron a secciones de 1  $\mu$ m. Las barras de escala en todas las imágenes son 10  $\mu$ m.

**Análisis de PLA.** Todos los reactivos usados para el análisis de PLA fueron de Olink Bioscience, Uppsala, Suecia, y todas las reacciones de PLA se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante en una cámara de humedad oscura con un volumen de muestra de 20  $\mu$ l por pocillo. Brevemente, las células se sembraron sobre portaobjetos de PLA recubiertos con teflón (Menzel-Gläser, Thermo Scientific) y se cultivaron durante dos días a 37 °C en 7,5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se fijaron con 100 % de metanol a -20 °C durante 5 min. Después de la fijación, las células se

trataron con 0,5 % de saponina en PBS durante 15 minutos a 4 °C y 15 minutos a TA, y se bloquearon en 5 % de BSA en PBS durante 60 minutos a 37 °C. Las células se incubaron con anticuerpos primarios (auto-producidos contra componentes del complejo de mTOR y astrina, dilución 1:50 en diluyente de anticuerpo) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se incubaron con las sondas de PLA correspondientes (anticuerpos secundarios conjugados con sondas de ADN únicas para anti-ratón, anti-conejo o anti-rata, respectivamente) durante 60 minutos a 37 °C. Para la ligación y circularización de los oligos de ADN, las células se incubaron con disolución de ligasa durante 30 minutos a 37 °C. Para la amplificación por círculo rodante, las células se incubaron con disolución de amplificación, que contenía un conector de ADN marcado con Alexa 555 complementario como fluoróforo detectable durante 120 minutos a 37 °C. Las células se montaron con un cubreobjetos (24x50 mm) usando un volumen mínimo de medio Duolink In Situ Mounting con DAPI y se analizaron por microscopía confocal (microscopio de barrido láser LSM 510 o LSM 780 META de Zeiss con un objetivo 63x/1.4 oil DIC), (Zeiss, Jena, Alemania). Las fotografías se tomaron con tamaño de marco óptimo de 1024x1024 (1764x1764) píxeles, velocidad de barrido 7 para las imágenes superiores y con intervalo dinámico de 12 bit (8 bit). El desplazamiento del amplificador y la ganancia del detector se ajustaron en primer lugar y nunca se cambiaron durante una sesión experimental. La relación señal por célula (números de puntos de PLA rojos por célula) se analizó con el software BlobFinder libremente distribuido (Centro de Análisis de la Imagen, Universidad de Uppsala, Suecia) que cuenta señales de PLA y núcleos como tamaño de píxel definido para cada célula individual.

**Cuantificaciones y estadística.** Todos los experimentos se realizaron en al menos N=3 duplicados. Las señales en IB se cuantificaron y se normalizaron como se describió (Dalle Pezze et al., 2012b). Para el análisis de datos de IB y PLA se usó la prueba de la t de Student bilateral no paramétrica que supone varianzas desiguales. El análisis estadístico se realizó con un intervalo de confianza de  $p < 0,05$ . Se eligió el error estándar de la media (EEM) para estimar la variabilidad estadística. Se calcularon diagramas de caja y bigotes con el software GraphPad Prism 6.01. Se calcularon los percentiles según la siguiente fórmula: Resultado = percentil \*  $[n(\text{valores})+1/100]$ . Se indica la mediana (centil 50), el centil 25 a 75 (caja) y el centil 5 a 95 (bigotes).

### 25 **La astrina es un interactor de raptor específico que inhibe el ensamblaje de mTORC1**

Para identificar novedosos reguladores de mTOR, los inventores inmunopurificaron mTOR endógeno, raptor (mTORC1) y Rictor (mTORC2) de células HeLa y analizaron los inmunoprecipitados (IP) por espectrometría de masas (EM) como se describió (Thedieck et al., 2007). Sorprendentemente, aunque generalmente se cree que raptor actúa en complejo con mTOR (Laplante, M. y Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. Cell 149, 274-293), los inventores identificaron astrina en IP de raptor (**Fig. 2**, cobertura de secuencia del 12 %), pero no IP de mTOR o Rictor. Esto sugirió que la astrina se une a raptor, cuando la última no está en un complejo con mTOR (mTORC1).

La astrina (UniProtKB: Q96R06) es una proteína grande de 160 y 140 kDa, la isoforma más pequeña que posiblemente surge de la escisión proteolítica. Los altos niveles de ARNm de astrina se correlacionan con pronóstico negativo en cáncer de mama y de pulmón (Buechler, S. (2009). Low expression of a few genes indicates good prognosis in estrogen receptor positive breast cancer. BMC Cancer 9, 243; Valk, K., Vooder, T., Kolde, R., Reintam, M.A., Petzold, C., Vilo, J. y Metspalu, A. (2010). Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers. Oncology 79, 283-292). Por tanto, los inventores analizaron la expresión de proteínas de astrina en tres líneas de células de cáncer de mama. Los niveles de proteína de astrina se correlacionaron positivamente con la actividad de Akt, y se correlacionaron negativamente con la fosforilación de los sustratos de mTORC1, PRAS40-S183 y p70-S6K1-T389.

La expresión en exceso de FLAG-astrina en células HeLa aumentó el nivel de raptor, reforzando la noción de una posible conexión funcional entre astrina y raptor. FLAG-astrina co-inmunoprecipitó con raptor, pero no con mTOR o el componente de mTORC2, Rictor, confirmando los datos de EM. Por tanto, la astrina endógena se co-inmunopurificó con raptor, pero no con mTOR (**Fig. 2**). Así, la astrina es un interactor específico del componente de mTORC1 esencial raptor, pero no de la propia cinasa de mTOR. Tras la incubación de células con el inhibidor de mTORC1 alostérico, rapamicina, durante 30 minutos seguido de IP, se observó que raptor se disociaba del complejo de mTOR-raptor, pero no se observó efecto sobre la unión astrina-raptor. Así, la actividad de mTORC1 no afecta la unión raptor-astrina. A diferencia, la inhibición de astrina afecta el ensamblaje de mTORC1, ya que la inactivación de ARNip de astrina produjo el aumento de las cantidades de mTOR en IP de raptor. Asimismo, la medición *in situ* de la asociación de mTOR-raptor por ensayo de ligación por proximidad (PLA) (Soderberg, O., Leuchowius, K.J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L.G. y Landegren, U. (2008). Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. Methods 45, 227-232) revelaron la drástica inducción del ensamblaje de mTORC1 tras la inactivación de astrina (**Figs. 3 y 4**). Los inventores llegan a la conclusión de que la astrina compete con mTOR por la unión a raptor, produciendo elevada formación de mTORC1 en ausencia de astrina.

### 60 **La astrina inhibe la señalización de mTORC1**

La astrina se ha descrito como un regulador de la progresión mitótica, y se ha propuesto para mTORC1 una función en la mitosis. Por tanto, los inventores probaron si la deficiencia de astrina alteraba la actividad de mTORC1 durante la mitosis. En células HeLa se detuvo en G2/M con nocodazol y - tras la liberación del bloque mitótico - se observó

una fosforilación del sustrato de mTORC1, p70-S6K1-T389. p70-S6K1-T389 solo se fosforiló débilmente en células mitóticas, y siguió sin alterarse tras la inhibición de astrina. A diferencia de las células mitóticas, la deficiencia de astrina indujo a p70-S6K1-pT389 en células no sincronizadas, sugiriendo una función reguladora de la astrina hacia mTORC1 fuera de la mitosis. La deficiencia de astrina en células no sincronizadas induce la fosforilación del sustrato de mTORC1, p70-S6K1-T389, y este efecto es independiente de las funciones mitóticas de la astrina. Para establecer adicionalmente la función de la astrina en la señalización de mTORC1, los inventores privaron de alimentos e indujeron células con insulina y aa durante 10 minutos para activar fuertemente la señalización de mTOR con y sin inactivación de astrina; y confirmaron la inducción de p70-S6K1-pT389 en células deficientes en astrina. El inhibidor específico de mTORC1, rapamicina, y el inhibidor análogo a ATP, PP242 (que se dirigen ambos a complejos de mTOR) inhibieron ambos potentemente p70-S6K1-pT389 en células deficientes en astrina. Así, el efecto inhibitorio de la astrina en p70-S6K1-pT389 es dependiente de mTORC1.

p70-S6K1 activado inhibe IRS1 por fosforilación en S636/639 (es decir, el NFL). En línea con mTORC1 activado y p70-S6K1 con deficiencia de astrina, los inventores encontraron que IRS-pS636/639 se indujo por ARNip de astrina. Los experimentos de tiempo-evolución tras la inducción de insulina/aa revelaron que la deficiencia de astrina acelera la inducción de la fosforilación de los sustratos de mTORC1 p70-S6K1-T389 y PRAS40-S183 mTORC1, y del sustrato de p70-S6K1 IRS1-S636/639 (5 minutos después de la inducción en siAstrina frente a 7 minutos en células de control, respectivamente). siAstrina también aceleró la aparición de NFL y la supresión resultante de p70-S6K1-pT389 (disminución en 7 minutos después de la inducción en células de siAstrina, en comparación con la inducción en estado estacionario de hasta 20 minutos después de la inducción en células de control). Así, las dinámicas globales de la red de mTORC1 se aceleran en ausencia de astrina. Un esquema de la regulación de mTORC1 por astrina se representa en la Fig. 1.

#### El complejo de astrina-raptor se localiza en gránulos de estrés (SG)

Para tratar adicionalmente la función biológica de la interacción de astrina-raptor, los inventores generaron construcciones de fusión de astrina-GFP recombinantes. La estructura modular de la astrina con su dominio de cabeza globular del extremo N y los dos dominios de bobina en espiral del extremo C (Gruber, J., Harborth, J., Schnabel, J., Weber, K. y Hatzfeld, M. (2002). The mitotic-spindle-associated protein astrin is essential for progression through mitosis. *J Cell Sci* 115, 4053-4059) sugirió que la astrina puede servir de proteína adaptadora. Así, los inventores generaron construcciones para astrina de longitud completa (GFP-astrina<sup>longitud completa</sup>), el dominio de cabeza del extremo N (GFP-Astrina<sup>1-481</sup>) y los dominios de bobina en espiral del extremo C (GFP-astrina<sup>482-1193</sup>) (esquema representado en la Fig. 5).

La GFP-astrina<sup>longitud completa</sup> se localizó dentro de las estructuras granulares citoplásmicas que también fueron visibles por microscopía óptica. De importancia, también la GFP-astrina<sup>482-1193</sup> del extremo C se localizó en las estructuras granulares citosólicas, mientras que la GFP-astrina<sup>1-481</sup> del extremo N mostró una localización citosólica difusa. A diferencia, la GFP-astrina<sup>longitud completa</sup> y la GFP-astrina<sup>1-481</sup> del extremo N se co-purificaron con raptor, mientras que la GFP-astrina<sup>482-1193</sup> del extremo C solo se asoció débilmente a raptor. Estos datos están en línea con el dominio de cabeza del extremo N de astrina, que media principalmente en la unión a raptor, mientras que los dominios de bobina en espiral del extremo C de astrina median principalmente en su localización. La unión de mTOR o astrina a raptor son mutuamente excluyentes.

Para analizar si la astrina endógena se localiza en SG, los inventores indujeron estrés oxidativo en células HeLa durante 30 minutos con arsenito 500 μM. El arsenito induce una gran variedad de ROS celulares (Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C.J. y Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol* 31, 95-107). El anticuerpo para astrina comercial como se usa detectó astrina-GFP en inmunofluorescencia (SI), confirmando su especificidad. En células no estresadas, la astrina endógena mostró un patrón de microtúbulos. El marcador de SG específico G3BP1 se localizó dentro de estructuras citoplásmicas granulares, es decir, SG tras el estrés con arsenito, y la astrina se co-localizó parcialmente con G3BP1, así la astrina se localiza en SG tras el estrés con arsenito. HA-raptor se co-localizó con astrina y G3BP1 dentro de SG. A diferencia, mTOR no se co-localizó con G3BP1. Así, tras el estrés oxidativo, la astrina y raptor se co-localizan con SG, mientras que mTOR sigue excluido de SG. Estos hallazgos condujeron a los inventores a la hipótesis de que la re-localización del complejo de astrina-raptor en SG podría desensamblar el complejo de mTOR-raptor bajo estrés oxidativo. De acuerdo con un complejo de astrina-raptor que se forma y se relocaliza en SG bajo estrés, la asociación de astrina con raptor aumentó fuertemente por arsenito en co-IP e *in situ* (Fig. 4).

Así, la formación del complejo de raptor-astrina y su asociación con SG se induce por estrés con arsenito.

Entonces se probó si estos efectos son específicos para arsenito, o podrían también observarse con otros estreses inductores de SG oxidativos. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induce SG. Por tanto, los experimentos anteriormente descritos se repitieron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM. Todos los resultados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reprodujeron aquellos obtenidos con arsenito, y así diferentes estreses oxidativos inducen el reclutamiento mediado por astrina de raptor a SG, conduciendo al desensamblaje de mTORC1.

### La represión de mTORC1 dependiente de SG y de astrina protege a las células cancerosas de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo

Para las implicaciones médicas de los presentes hallazgos, se correlacionan altos niveles de astrina con agresividad de células cancerosas (Buechler, 2009; Valk et al., 2010), además de alta señalización de Akt y baja de mTORC1 en células de tumor de mama. El estrés por rédox debido a hipoxia es una condición común en tumores, y las células tumorales necesitan evadirse de la apoptosis en respuesta a ataques oxidativos (Fruehauf, J.P. y Meyskens, F.L., Jr. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 13, 789-794; Sosa et al., 2012). En línea, la quimiorresistencia de células cancerosas frecuentemente se basa en su elevada capacidad para suprimir la apoptosis (Ajabnoor, G.M., Crook, T. y Coley, H.M. (2012). Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Death Dis* 3, e260). Aunque se cree que mTOR activo promueve el crecimiento celular y así inhibe la apoptosis, la señalización de mTORC1 hiperactivo sensibiliza a las células para la apoptosis (Thedieck et al., 2007). De forma interesante, la deficiencia de astrina facilita la apoptosis, y los inventores encontraron que la siAstrina sensibilizó las células HeLa a la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se mide por PAR escindido). Y, lo que es más importante, la inducción de apoptosis dependiente de astrina se inhibió por la inhibición de mTORC1 mediada por shRaptor, y los inventores llegan a la conclusión de que la supresión de mTORC1 por astrina protege a las células HeLa del estrés oxidativo contra la apoptosis. Estos hallazgos también se traducen en otras células cancerosas, como se mostró en varias líneas de células de cáncer de mama, tales como células de cáncer de mama MCF-7. En resumen, la astrina inhibe la apoptosis en células cancerosas previniendo la hiperactivación de mTORC1 bajo estrés oxidativo (véase la **Fig. 6**).

En el contexto de la presente invención, la astrina y su interacción con raptor se identificaron como componentes críticos novedosos de la red de mTORC1. La astrina recluta raptor a SG, conduciendo al desensamblaje de mTORC1 que limita la actividad de mTORC1 en condiciones que inducen mTORC1, que incluyen la estimulación de nutrientes y de insulina, además de estrés oxidativo y por calor. La presente invención desenreda la astrina como el enlace clave que disocia mTORC1 y limita su actividad en células metabólicamente expuestas. La inhibición de tanto astrina como SG bajo estrés transitorio produce células que se someten a apoptosis debido a la hiperactivación de mTORC1, subrayando la importancia crítica de la astrina y SG en limitar la actividad de mTORC1. El inhibidor de mTORC1, rapamicina, prolonga la vida (Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392-395) y previene el desarrollo del cáncer (Anisimov, V.N., Zabezhinski, M.A., Popovich, I.G., Piskunova, T.S., Semchenko, A.V., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Antoch, M.P., y Blagosklonny, M.V. (2010). Rapamycin extends maximal lifespan in cancer-prone mice. *Am J Pathol* 176, 2092-2097). Así, la activación de mTORC1 mediada por ROS puede ser importante para la función celular normal, y también puede participar en el envejecimiento y el desarrollo de cáncer. Los datos de los presentes inventores soportan esta función dual, ya que el agotamiento de astrina y la hiperactivación de mTORC1 resultante fomentan la muerte celular bajo estrés transitorio, pero el aumento de los niveles de astrina se correlacionó positivamente con la progresión del cáncer (Buechler, 2009; Valk et al., 2010).

Un efecto de la inhibición de mTORC1 mediada por astrina es la inactivación de NFL dependiente de mTORC1 hacia Akt. La activación de Akt produce elevada fosforilación e inactivación de FoxO-1/3A, un mecanismo que es muy conocido para prevenir la apoptosis (Appenzeller-Herzog, C. y Hall, M.N. (2012). Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends Cell Biol* 22, 274-282). En células sanas, la supresión mediada por astrina puede ser beneficiosa, ya que previene que las células experimenten apoptosis tras los estreses transitorios o desafío metabólico. A diferencia, en células cancerosas, la supresión de mTORC1 y de la apoptosis mediada por astrina puede llegar a ser perjudicial, ya que previene que las células que crecen demasiado experimenten muerte celular programada. El entendimiento de este proceso abre nuevas vías a la terapia del cáncer. En particular, la astrina es altamente expresada en células tumorales (Buechler, 2009; Valk et al., 2010) y espermatozoides, mientras que aparece solo a bajos niveles en todos los otros tejidos no de cáncer (análisis GeneNote, [www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPAG5](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPAG5)). Por tanto, la inhibición de astrina puede permitir modular la actividad de la red de mTOR específicamente en células tumorales, y esto puede ser particularmente beneficioso para restaurar NFL y lograr la sensibilización a la apoptosis cuando Akt es hiperactiva, una condición frecuentemente encontrada en cánceres agresivos (Spears, M., Cunningham, C.A., Taylor, K.J., Mallon, E.A., Thomas, J.S., Kerr, G.R., Jack, W.J., Kunkler, I.H., Cameron, D.A., Chetty, U., et al. (2012). Proximity ligation assays for isoform-specific Akt activation in breast cancer identify activated Akt1 as a driver of progression. *J Pathol* 227, 481-489). La progresión del ciclo celular defectuosa en células deficientes en astrina podría limitar la idoneidad de la astrina como diana terapéutica, pero ratones deficientes en astrina (Xue, J., Tarnasky, H.A., Rancourt, D.E. y van Der Hoorn, F.A. (2002). Targeted disruption of the testicular SPAG5/deepst protein does not affect spermatogenesis or fertility. *Mol Cell Biol* 22, 1993-1997) y ratas (Yagi, M., Takenaka, M., Suzuki, K. y Suzuki, H. (2007). Reduced mitotic activity and increased apoptosis of fetal sertoli cells in rat hypogonadic (hgn/hgn) testes. *J Reprod Dev* 53, 581-589) son viables, sin presentar fenotipos importantes. Así, es concebible elegir como diana la astrina en enfermedad humana sin afectar las funciones vitales.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Albert-Ludwigs-Universitat Freiburg

<120> Moduladores de la interacción de astrina y raptor, y usos de los mismos en terapia del cáncer

<130> U30483EP

5 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1179

<212> PRT

10 <213> Homo Sapiens

<400> 1

```

Met Trp Arg Val Lys Lys Leu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Ser Pro Gln
 1          5          10          15

Thr Gly Lys Pro Ser Met Arg Thr Pro Leu Arg Glu Leu Thr Leu Gln
      20          25          30

Pro Gly Ala Leu Thr Asn Ser Gly Lys Arg Ser Pro Ala Cys Ser Ser
      35          40          45

Leu Thr Pro Ser Leu Cys Lys Leu Gly Leu Gln Glu Gly Ser Asn Asn
 50          55          60

Ser Ser Pro Val Asp Phe Val Asn Asn Lys Arg Thr Asp Leu Ser Ser
 65          70          75          80

Glu His Phe Ser His Ser Ser Lys Trp Leu Glu Thr Cys Gln His Glu
      85          90          95

Ser Asp Glu Gln Pro Leu Asp Pro Ile Pro Gln Ile Ser Ser Thr Pro
      100          105          110

Lys Thr Ser Glu Glu Ala Val Asp Pro Leu Gly Asn Tyr Met Val Thr
      115          120          125

Ile Val Leu Val Pro Ser Pro Leu Gly Gln Gln Gln Asp Met Ile Phe
 130          135          140

Glu Ala Arg Leu Asp Thr Met Ala Glu Thr Asn Ser Ile Ser Leu Asn
 145          150          155          160

Gly Pro Leu Arg Thr Asp Asp Leu Val Arg Glu Glu Val Ala Pro Cys
      165          170          175

Met Gly Asp Arg Phe Ser Glu Val Ala Ala Val Ser Glu Lys Pro Ile

```



ES 2 588 778 T3

Arg Asp Trp Lys Ser Gln Leu Ala Val Pro His Pro Glu Thr Gln Asp  
 450 455 460

Ser Ser Thr Gln Thr Asp Thr Ser His Ser Gly Ile Thr Asn Lys Leu  
 465 470 475 480

Gln His Leu Lys Glu Ser His Glu Met Gly Gln Ala Leu Gln Gln Ala  
 485 490 495

Arg Asn Val Met Gln Ser Trp Val Leu Ile Ser Glu Leu Ile Ser Leu  
 500 505 510

Leu His Leu Ser Leu Leu His Leu Glu Glu Asp Lys Thr Thr Val Ser  
 515 520 525

Gln Glu Ser Arg Arg Ala Glu Thr Leu Val Cys Cys Cys Phe Asp Leu  
 530 535 540

Leu Lys Lys Leu Arg Ala Lys Leu Gln Ser Leu Lys Ala Glu Arg Glu  
 545 550 555 560

Glu Ala Arg His Arg Glu Glu Met Ala Leu Arg Gly Lys Asp Ala Ala  
 565 570 575

Glu Ile Val Leu Glu Ala Phe Cys Ala His Ala Ser Gln Arg Ile Ser  
 580 585 590

Gln Leu Glu Gln Asp Leu Ala Ser Met Arg Glu Phe Arg Gly Leu Leu  
 595 600 605

Lys Asp Ala Gln Thr Gln Leu Val Gly Leu His Ala Lys Gln Glu Glu  
 610 615 620

Leu Gln Gln Thr Val Ser Leu Thr Ser Leu Gln Gln Asp Trp Arg Ser  
 625 630 635 640

Met Gln Leu Asp Tyr Thr Thr Trp Thr Ala Leu Leu Ser Arg Ser Arg  
 645 650 655

Gln Leu Thr Glu Lys Leu Thr Val Lys Ser Gln Gln Ala Leu Gln Glu  
 660 665 670

Arg Asp Val Ala Ile Glu Glu Lys Gln Glu Val Ser Arg Val Leu Glu  
 675 680 685

Gln Val Ser Ala Gln Leu Glu Glu Cys Lys Gly Gln Thr Glu Gln Leu  
 690 695 700

ES 2 588 778 T3

Glu Leu Glu Asn Ser Arg Leu Ala Thr Asp Leu Arg Ala Gln Leu Gln  
 705 710 715 720  
 Ile Leu Ala Asn Met Asp Ser Gln Leu Lys Glu Leu Gln Ser Gln His  
 725 730 735  
 Thr His Cys Ala Gln Asp Leu Ala Met Lys Asp Glu Leu Leu Cys Gln  
 740 745 750  
 Thr Gln Ser Asn Glu Glu Gln Ala Gln Trp Gln Lys Glu Glu Met Ala  
 755 760 765  
 Leu Lys His Met Gln Ala Glu Leu Gln Gln Gln Ala Val Leu Ala  
 770 775 780  
 Lys Glu Val Arg Asp Leu Lys Glu Thr Leu Glu Phe Ala Asp Gln Glu  
 785 790 795 800  
 Asn Gln Val Ala His Leu Glu Leu Gly Gln Val Glu Cys Gln Leu Lys  
 805 810 815  
 Thr Thr Leu Glu Val Leu Arg Glu Arg Ser Leu Gln Cys Glu Asn Leu  
 820 825 830  
 Lys Asp Thr Val Glu Asn Leu Thr Ala Lys Leu Ala Ser Thr Ile Ala  
 835 840 845  
 Asp Asn Gln Glu Gln Asp Leu Glu Lys Thr Arg Gln Tyr Ser Gln Lys  
 850 855 860  
 Leu Gly Leu Leu Thr Glu Gln Leu Gln Ser Leu Thr Leu Phe Leu Gln  
 865 870 875 880  
 Thr Lys Leu Lys Glu Lys Glu Gln Glu Thr Leu Leu Leu Ser Thr Ala  
 885 890 895  
 Cys Pro Pro Thr Gln Glu His Pro Leu Pro Asn Asp Arg Thr Phe Leu  
 900 905 910  
 Gly Ser Ile Leu Thr Ala Val Ala Asp Glu Glu Pro Glu Ser Thr Pro  
 915 920 925  
 Val Pro Leu Leu Gly Ser Asp Lys Ser Ala Phe Thr Arg Val Ala Ser  
 930 935 940  
 Met Val Ser Leu Gln Pro Ala Glu Thr Pro Gly Met Glu Glu Ser Leu  
 945 950 955 960



ES 2 588 778 T3

Ala Glu Met Ser Ile Met Thr Thr Glu Leu Gln Ser Leu Cys Ser Leu  
 965 970 975

Leu Gln Glu Ser Lys Glu Glu Ala Ile Thr Leu Gln Arg Lys Ile Cys  
 980 985 990

Glu Leu Gln Ala Arg Leu Gln Ala Gln Glu Glu Gln His Gln Glu Val  
 995 1000 1005

Gln Lys Ala Lys Ala Asp Ile Glu Lys Leu Asn Gln Ala Leu Cys  
 1010 1015 1020

Leu Arg Tyr Lys Asn Glu Lys Glu Leu Gln Glu Val Ile Gln Gln  
 1025 1030 1035

Gln Asn Glu Lys Ile Leu Glu Gln Ile Asp Lys Ser Gly Glu Leu  
 1040 1045 1050

Ile Ser Leu Arg Glu Glu Val Thr His Leu Thr Arg Ser Leu Arg  
 1055 1060 1065

Arg Ala Glu Thr Glu Thr Lys Val Leu Gln Glu Ala Leu Ala Gly  
 1070 1075 1080

Gln Leu Asp Ser Asn Cys Gln Pro Met Ala Thr Asn Trp Ile Gln  
 1085 1090 1095

Glu Lys Val Trp Leu Ser Gln Glu Val Asp Lys Leu Arg Val Phe  
 1100 1105 1110

Leu Glu Met Lys Asn Glu Lys Glu Lys Leu Met Ile Lys Phe Gln  
 1115 1120 1125

Ser His Arg Asn Ile Leu Glu Glu Asn Leu Arg Ser Asp Lys Glu  
 1130 1135 1140

Leu Glu Lys Leu Asp Asp Ile Val Gln His Ile Tyr Lys Thr Leu  
 1145 1150 1155

Leu Ser Ile Pro Glu Val Val Arg Gly Cys Lys Glu Leu Gln Gly  
 1160 1165 1170

Leu Leu Glu Phe Leu Ser  
 1175

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de identificación de un compuesto que modula la interacción de astrina con raptor en una célula, que comprende las etapas de
  - a) poner en contacto al menos uno de astrina, un fragmento de unión a raptor de astrina y/o una célula que expresa astrina o un fragmento de unión a raptor de la misma con al menos un compuesto que posiblemente modula la interacción de astrina con raptor en una célula, y
  - b) identificar una modulación de la unión de astrina o dicho fragmento a raptor en presencia de dicho al menos un compuesto.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha modulación está seleccionada de una disminución o un aumento de dicha unión a raptor.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha astrina o dicho fragmento de unión a raptor de astrina es parte o está asociado a gránulos de estrés.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha identificación comprende un método seleccionado de rtPCR, inmunoprecipitación y medición de la inducción o reducción de la apoptosis en dicha célula.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto está seleccionado del grupo que consiste en una biblioteca de péptidos, una biblioteca combinatoria, un extracto celular, en particular un extracto de células de planta, un "fármaco de molécula pequeña", un oligonucleótido antisentido, un ARNip, un ARNm y un anticuerpo o fragmento del mismo, que interfiere específicamente con la unión de astrina a raptor.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha célula está seleccionada del grupo de células cancerosas, células huésped recombinantes de células madre no embrionarias humanas que expresan astrina o el fragmento de unión a raptor de la misma, en el que dichas células huésped recombinantes opcionalmente expresan raptor, células de levadura y células bacterianas recombinantes.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho fragmento de unión a raptor de astrina comprende el dominio de cabeza del extremo N del polipéptido de astrina, por ejemplo, los aminoácidos 1-481 del extremo N del polipéptido de astrina.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además probar dicho compuesto como se identifica para su actividad para sensibilizar células tumorales a la apoptosis.
9. Uso de una herramienta de cribado para cribar un compuesto que modula la interacción de astrina con raptor en una célula, que comprende una célula aislada que expresa astrina, y/o que expresa un fragmento de unión a raptor de la misma, en el que dicha célula opcionalmente expresa raptor y/o un fragmento de unión de astrina del mismo, en el que dicha célula no es una célula madre embrionaria humana.
10. Uso de la herramienta de cribado según la reivindicación 9, en el que dicha célula está seleccionada del grupo de células cancerosas, células huésped recombinantes que expresan astrina o el fragmento de unión a raptor de la misma, células de levadura y células bacterianas recombinantes, en el que dicha célula recombinante expresa opcionalmente raptor y/o fragmento de unión de astrina del mismo.
11. Uso de la herramienta de cribado según la reivindicación 9 o 10, en el que dicha astrina y/o raptor y/o los fragmentos de los mismos se marcan.
12. Uso de la herramienta de cribado según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicho fragmento de unión a raptor de astrina comprende el dominio de cabeza del extremo N del polipéptido de astrina, por ejemplo, los aminoácidos 1-481 del extremo N del polipéptido de astrina.

Figura 1

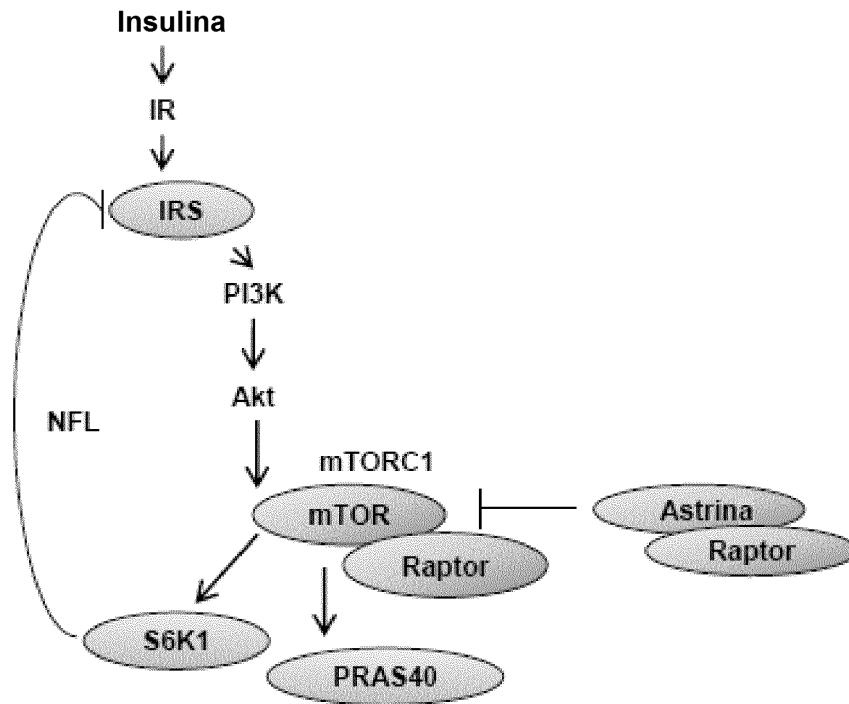


Figura 2

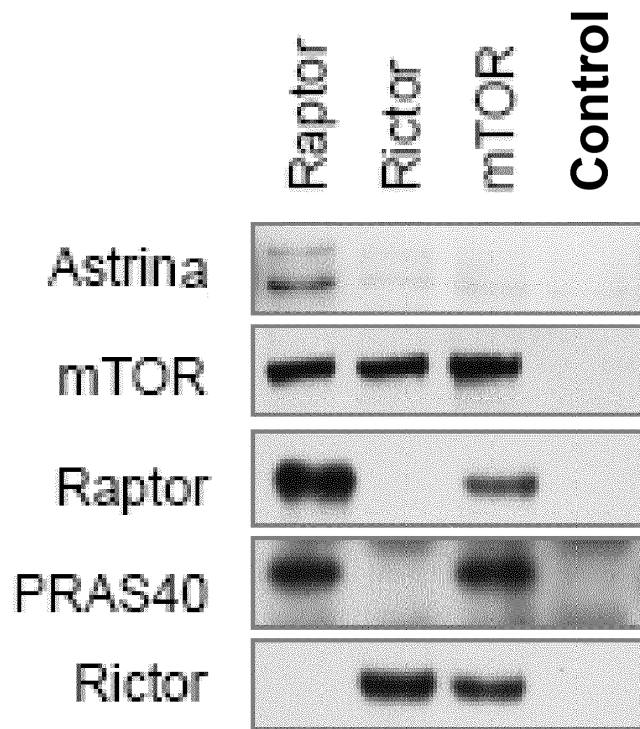


Figura 3

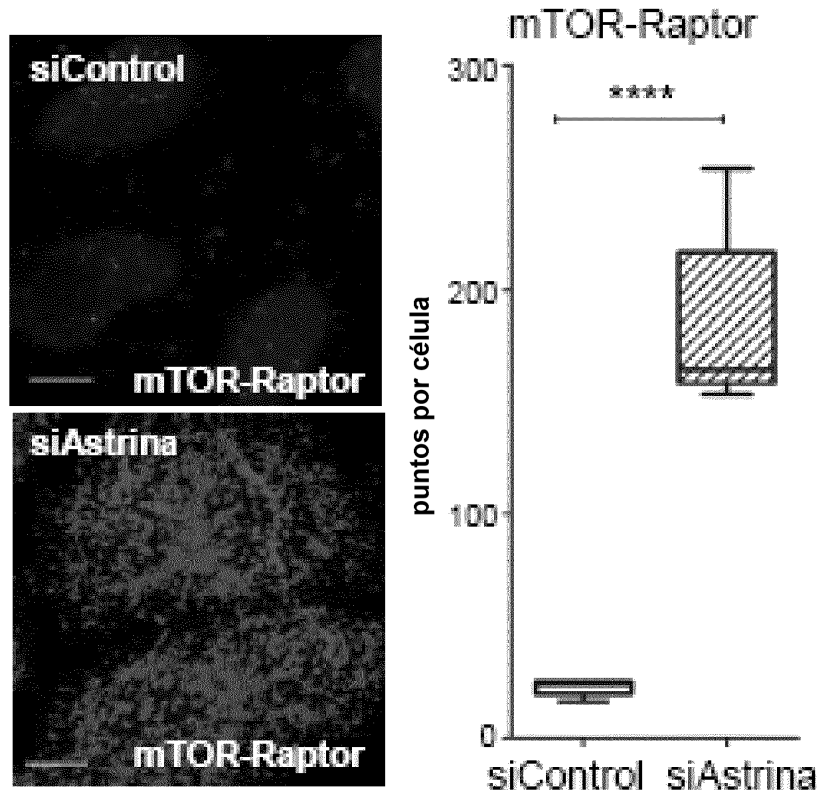


Figura 4

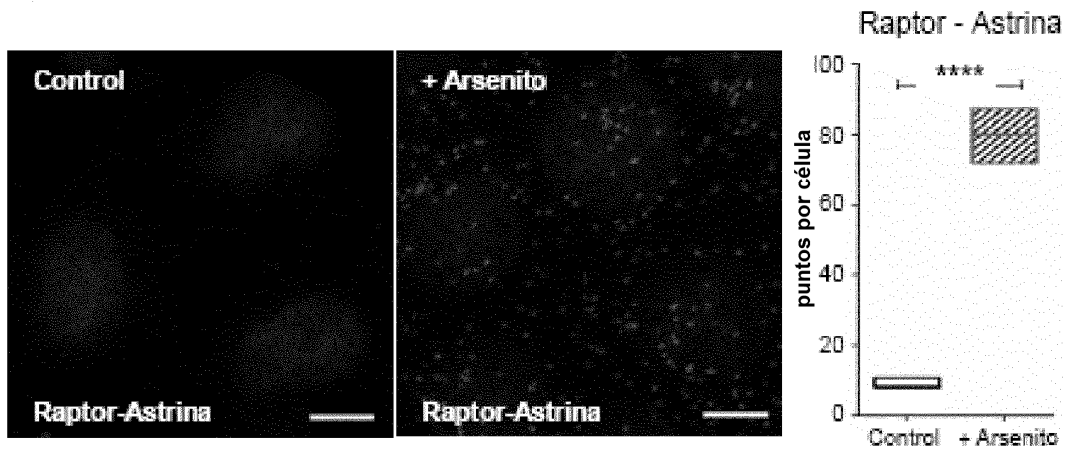


Figura 5

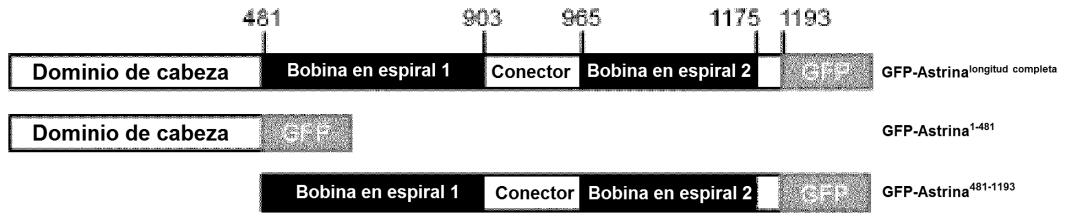


Figura 6

