

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 932**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01) **A61K 31/711** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) **C12N 15/113** (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2011 PCT/JP2011/064163**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12176282**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2011 E 11868386 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2724729**

54 Título: **Agente inductor de apoptosis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2019

73 Titular/es:
NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)
1-1-2, Shimohozumi
Ibaraki-shi, Osaka 567-8680, JP

72 Inventor/es:
NIITSU, YOSHIRO y
NISHITA, HIROKI

74 Agente/Representante:
MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 708 932 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

Agente inductor de apoptosis

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere al uso novedoso de GST- π y a un agente supresor de la misma, a un agente inductor de apoptosis novedoso, a una composición farmacéutica que contiene el agente inductor de apoptosis y a un método terapéutico novedoso para una enfermedad asociada con apoptosis anómala.

10

Técnica anterior

El cáncer es una de las enfermedades más importantes y problemáticas a las que se enfrenta la humanidad, y está llevándose a cabo una enorme cantidad de esfuerzo de investigación en el tratamiento del mismo. El cáncer es una enfermedad en la que las células crecen de manera incontrolable debido a mutación génica, anomalía epigenética, etc. Con respecto a las anomalías genéticas en cáncer, se han notificado ya un gran número (por ejemplo, Futreal *et al.*, Nat Rev Cancer. 2004; 4 (3):177-83, etc.), y se cree que muchas de las mismas están asociadas en parte con la transducción de señales relacionada con proliferación, diferenciación y supervivencia celulares. Además, debido a tales anomalías genéticas, se producen anomalías en la transducción de señales en células que consiste en moléculas normales, y esto provoca activación o inactivación de una cascada de señales específica y puede convertirse finalmente en un factor que desencadena la proliferación celular anómala. El tratamiento temprano del cáncer se ha centrado en la supresión de la propia proliferación celular, pero puesto que un tratamiento de este tipo también suprime la proliferación de células con proliferación fisiológicamente normal, iba acompañado por efectos secundarios tales como pérdida de cabello, disfunción gastrointestinal o supresión de la médula ósea. Con el fin de reducir tales efectos secundarios, está emprendiéndose el desarrollo de fármacos para el tratamiento de cáncer basándose en un nuevo concepto tal como fármacos dirigidos molecularmente que seleccionan como diana anomalías genéticas específicas de cáncer o anomalías en la transducción de señales.

15

20

25

30

35

Como anomalía genética específica de cáncer, se conoce bien la anomalía de KRAS (homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata de Kirsten V-Ki-ras2). KRAS es una proteína de unión a GTP de bajo peso molecular (también denominada proteína G de bajo peso molecular) situada posteriormente a un receptor tirosina cinasa tal como EGFR o PDGFR, y se encarga de transferir una señal relacionada con proliferación o diferenciación desde estos receptores hasta una cascada de MAPK posterior. KRAS normal se activa por medio de Grb2 y SOS por medio de activación por tirosina cinasa de un receptor activado por unión de ligando, y fosforila una MAPK tal como Raf para que dirija la cascada de MAPK, pero KRAS mutado se activa de manera constante sin estimulación a partir del receptor y sigue transmitiendo una señal de proliferación. Se cree que, debido a esto, se produce proliferación celular anómala.

40

45

50

Por otro lado, la expresión de glutatión-S-transferasa (GST), que es una de las enzimas que catalizan la conjugación de glutatión, en particular GST- π (glutatión-S-transferasa pi, también denominada GSTP1), aumenta en diversas células cancerosas, y se ha señalado que existe la posibilidad de que este sea un factor para la resistencia a algunos antineoplásicos. De hecho, se sabe que cuando se prepara ADN antisentido de GST- π o un inhibidor de GST- π para actuar sobre una línea celular cancerosa que está sobreexpresando GST- π y que presenta resistencia farmacológica, se suprime la resistencia farmacológica (Takahashi y Niitsu, Gan To Kagaku Ryoho. 1994; 21 (7): 945-51, Ban *et al.*, Cancer Res. 1996; 56 (15): 3577-82, Nakajima *et al.*, J Pharmacol Exp Ther. 2003; 306 (3): 861-9). Además, en un informe reciente, cuando se prepara ARNip de GST- π para actuar sobre una línea celular de cáncer de próstata andrógeno-independiente que está sobreexpresando GST- π , la proliferación de la misma se suprime y aumenta la apoptosis (Hokaiwado *et al.*, Carcinogenesis. 2008; 29 (6): 1134-8). Además, se ha sugerido que en cáncer colorrectal humano, la mutación de KRAS parece inducir sobreexpresión de GST- π por medio de activación de AP-1 (Miyaniishi *et al.*, Gastroenterology. 2001; 121 (4): 865-74).

55

60

Sin embargo, hasta la fecha apenas ha habido alguna aclaración de la relación entre GST- π y la proliferación o apoptosis celular, el mecanismo molecular de GST- π , y el papel, etc., de GST- π en diversos tipos de transducción de señales intracelulares. La transducción de señales intracelulares es muy complicada; una molécula puede influir en el efecto de una pluralidad de moléculas, o a la inversa una molécula puede verse influida por una pluralidad de moléculas, cuando se inhibe el efecto de una determinada molécula, puede activarse otra cascada de señales, y no puede obtenerse a menudo un efecto esperado. Por tanto, es necesario dilucidar el complicado mecanismo de transducción de señales celulares con el fin de desarrollar mejores fármacos dirigidos molecularmente, pero se ha dilucidado solamente una parte muy pequeña del mecanismo en muchos años de investigación, y se necesita un esfuerzo de investigación adicional.

Sumario

[Problemas que van a solucionarse]

65 La invención actual se define, entre otros, mediante los siguientes puntos:

1. Una composición para el uso en el tratamiento de cáncer debido a sobreexpresión de GST- π y mutación de KRAS, en la que la composición comprende como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia, en la que el fármaco que suprime la autofagia es un inhibidor de PI3K, y en la que el inhibidor de PI3K es un inhibidor de PI3K de clase III.

5 2. La composición según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de PI3K es 3-metiladenina.

10 3. La composición según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de PI3K se selecciona del grupo que consiste en una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido de quimera de ADN/ARN y un vector que expresa el mismo.

15 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fármaco que suprime GST- π se selecciona del grupo que consiste en una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido de quimera de ADN/ARN y un vector que expresa el mismo.

20 Un objeto de la presente descripción es proporcionar usos novedosos de GST- π y un agente supresor de la misma, una composición para inducir apoptosis eficazmente en células y un método que usa la misma.

[Medios para solucionar los problemas]

25 Mientras llevaban a cabo una investigación intensiva con el fin de dilucidar el mecanismo molecular de GST- π , los presentes inventores han encontrado que, cuando se inhibe la expresión de GST- π , la activación de Raf-1, MEK y ERK se inhibe en gran medida, y de manera similar en la cascada de señales de PI3K (fosfoinosítido 3-cinasa), que se activa mediante activación de un receptor acoplado a proteína G o un receptor tirosina cinasa, se produce la supresión de la transducción de señales, y han aclarado que, aunque la apoptosis está provocada por la inhibición de la expresión de GST- π , la autofagia se induce más rápidamente que la apoptosis. Como resultado de una investigación adicional, se ha encontrado adicionalmente que suprimiendo la autofagia al mismo tiempo que se inhibe GST- π , puede inducirse a las células a que experimenten apoptosis con alta eficacia, y por tanto se ha logrado la presente descripción.

Es decir, la presente descripción se refiere a lo siguiente.

35 (1) Un agente para inducir apoptosis, conteniendo el agente como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia.

40 (2) Un agente para inducir apoptosis en una célula en la que se suprime GST- π , conteniendo el agente como principio activo un fármaco que suprime la autofagia.

(3) El agente según (1) o (2) anterior, siendo el agente para inducir apoptosis en una célula que tiene KRAS mutado.

45 (4) El agente según uno cualquiera de (1) a (3) anteriores, en el que el principio activo se selecciona del grupo que consiste en una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido de quimera de ADN/ARN y un vector que expresa el mismo.

(5) Una composición farmacéutica que contiene el agente según uno cualquiera de (1) a (4) anteriores.

50 (6) La composición farmacéutica según (5) anterior, siendo la composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por proliferación celular anómala.

(7) La composición farmacéutica según (5) anterior, siendo la composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por mutación de KRAS.

55 (8) La composición farmacéutica según (5) anterior, siendo la composición para su uso en el tratamiento de un cáncer.

60 (9) Un agente para promover la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, conteniendo el agente como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma.

(10) Un agente para suprimir la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, conteniendo el agente como principio activo un fármaco que suprime GST- π .

65 (11) Un agente para suprimir la ubiquitinación, conteniendo el agente como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma.

(12) Un agente para promover la ubiquitinación, conteniendo el agente como principio activo un fármaco que suprime GST- π .

5 (13) Un agente para suprimir la autofagia, conteniendo el agente como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma.

(14) Un agente para promover la autofagia, conteniendo el agente como principio activo un fármaco que suprime GST- π .

10 [Efectos]

Puesto que el agente inductor de apoptosis de la presente descripción puede inducir apoptosis eficazmente en comparación con uno convencional, su eficacia como composición farmacéutica es también alta. En el tratamiento de cáncer en particular, puesto que las células cancerosas pueden destruirse mediante apoptosis, no solamente es posible inhibir el progreso del cáncer, sino que también puede expresarse un efecto de regresión del cáncer. Además, puesto que puede presentarse el mismo nivel de efecto que el de una formulación convencional con una dosis inferior a la de una convencional, es posible reducir los efectos secundarios.

20 Además, según la presente descripción, el mecanismo molecular de GST- π ha quedado claro y se ha descubierto un uso novedoso de GST- π o un agente supresor de la misma. Esto proporciona nuevas opciones para el tratamiento de enfermedades, técnicas experimentales, etc., y puede esperarse una enorme contribución no solamente a la medicina y medicina veterinaria sino también a los campos de la biología, bioquímica, biología molecular, etc.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 a) es el resultado de una inmunotransferencia de tipo Western que muestra un estado en el que la expresión de GST- π está específicamente suprimida por ARNip de GST- π . La figura 1 b) es un diagrama que muestra el cambio en el número de células y el nivel de expresión de GST- π el día 1.º a 4.º tras la transfección de ARNip de GST- π .

30 La figura 2 es el resultado de una inmunotransferencia de tipo Western que muestra el estado de expresión de proteínas implicadas en la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK el 2.º día tras la transfección de ARNip de GST- π . Puede observarse que, acompañando a la supresión de la expresión de GST- π , el nivel de expresión de proteína Raf disminuye y, además, se suprime la fosforilación de una MAPK tal como MEK o ERK.

35 La figura 3 muestra el resultado de un experimento sobre la inmunoprecipitación de la proteína Raf. Puede observarse que en un grupo tratado con ARNip de GST- π la expresión de proteína Raf y proteína Raf fosforilada en Ser621 (p-Raf-1 (S621)) disminuía ligeramente, mientras que en cambio la proteína Raf ubiquitinada aumentaba.

40 La figura 4 es un diagrama que compara la abundancia de la proteína Raf cuando se trataron transfectante de ARNip de GST- π y transfectante de ARNip revuelto con el inhibidor del proteosoma MG132 y DMSO, que era un control negativo. Se observó que para el transfectante de ARNip de GST- π , el tratamiento con inhibidor del proteosoma aumentaba la abundancia de proteína Raf fosforilada (p-Raf-1 (S338)), pero no se observó ningún cambio para ARNip revuelto. Es decir, esto sugiere que debido a la supresión de la expresión de GST- π , la proteína Raf fosforilada experimenta degradación por el proteosoma, y esto concuerda con el aumento en proteína Raf ubiquitinada en la figura 3.

45 La figura 5 muestra los resultados de un experimento sobre la coimmunoprecipitación de proteína Raf y GST- π . Debido a que se muestra una reacción hacia anticuerpo anti-GST- π para proteína precipitada por anticuerpo anti-p-Raf-1, se sugiere que p-Raf-1 y GST- π forman un complejo.

50 La figura 6 muestra imágenes de tinción por inmunofluorescencia de células con GST- π desactivada. Las filas superiores son imágenes teñidas con anticuerpo anti-LC3, y las filas inferiores son imágenes teñidas con DAPI. Desde la parte superior izquierda hay imágenes teñidas de los días 1.º, 2.º y 3.º tras la transfección, y desde la parte inferior izquierda de los días 4.º y 5.º día tras transfección, respectivamente. En células marcadas mediante flechas en la figura, se observó una señal de punto que puede considerarse que es un autofagosoma, deduciendo que se induce autofagia.

55 La figura 7 muestra imágenes de microscopio electrónico de células con GST- π desactivada en el punto de tiempo cuando habían transcurrido 2 días tras la transfección de ARNip de GST- π . En la figura a mano izquierda, N indica el núcleo, y la figura a mano derecha es una imagen alargada de la parte A rodeada por el recuadro. En la figura a mano derecha, M indica mitocondria y L indica lisosoma. Se observó que se formaron autofagosomas de modo que rodeaban la mitocondria en las zonas mostradas por las flechas.

60 La figura 8 muestra los resultados de una inmunotransferencia de tipo Western de un extracto celular con GST- π desactivada (KD) usando anticuerpo anti-LC3. Se observó que en células con GST- π KD (ARNip de GST- π), la

expresión de LC3 aumentada notablemente en comparación con el control (ARNip revuelto). Puesto que LC3 de tipo II (LC3-II) en particular aumentaba enormemente, esto implica la inducción de autofagosoma.

5 La figura 9 muestra los resultados de la tinción TUNEL. La fila superior muestra imágenes de un grupo de control y la fila inferior muestra imágenes de un grupo de células con GST- π KD. Muestra desde la izquierda imágenes teñidas de los días 3.º, 4.º y 5.º tras la transfección. En el grupo de células con GST- π KD, se observaron células positivas para TUNEL.

10 La figura 10 es un gráfico (parte superior) que muestra el cambio a lo largo del tiempo de las proporciones de células positivas para autofagia y células positivas para apoptosis en un grupo de células con GST- π KD y un grupo de células de control en el punto de tiempo cuando habían transcurrido de 1 a 4 días tras la transfección de ARNip, y un diagrama (parte inferior) que muestra el nivel de expresión de GST- π en células con GST- π KD. Muestra que en el grupo de control apenas se observó autofagia o apoptosis, mientras que en el grupo de GST- π KD las células positivas para autofagia aumentaron rápidamente en primer lugar con un pico el 2.º día, y luego se indujo apoptosis.

15 La figura 11 muestra los resultados de una inmunotransferencia de tipo Western de proteína implicada en la señalización de EGFR/PI3K/Akt/mTOR en células con GST- π KD. Puede observarse que en un grupo de células con GST- π KD, la fosforilación de EGFR, PI3K y Akt se suprimió notablemente.

20 La figura 12 muestra los resultados de una inmunotransferencia de tipo Western que muestra el cambio en la expresión de EGFR fosforilado (p-EGFR) cuando se trataron células con GST- π KD con inhibidor del proteosoma MG132. Puesto que una disminución en el nivel de expresión de p-EGFR en células con GST- π KD se recuperó mediante tratamiento con inhibidor del proteosoma, se dedujo que la disminución en la expresión de p-EGFR se debía a la degradación por el proteosoma.

25 La figura 13 muestra el resultado de una inmunotransferencia de tipo Western de proteína coimmunoprecipitada usando anti-p-EGFR. Puesto que se observó una señal para anticuerpo anti-GST-n, se dedujo que p-EGFR y GST- π interaccionaban entre sí.

30 La figura 14 muestra los resultados cuando se examina el cambio del nivel de expresión de proteína Raf y EGFR dependiendo de la concentración de inhibidor cuando se usó el inhibidor de GST- π C16C2. Se observó que, como en el caso con la desactivación de GST- π , la fosforilación de EGFR o proteína Raf también se suprimió cuando se usó el inhibidor de GST- π .

35 La figura 15 es un gráfico que muestra el cambio en el número de células cuando se añadió el inhibidor de GST- π C16C2. Puede observarse que cuando se añadió el inhibidor de GST- π , apenas hubo un aumento en el número de células.

40 La figura 16 es un gráfico que muestra la proporción de células positivas para autofagia en un grupo tratado con ARNip revuelto, un grupo con GST- π KD y un grupo con GST- π KD + 3MA. Puede observarse que la autofagia que había aumentado mediante la desactivación de GST- π se suprimió mediante 3-MA.

45 La figura 17 muestra imágenes teñidas con TUNEL cuando se añadió 3-MA a células con GST- π KD. La fila superior es un caso en el que se añadió 3-MA a 1 mM, y la fila inferior es un caso en el que se añadió 3-MA a 5 mM. Se muestra desde la izquierda imágenes teñidas los días 2.º, 3.º y 4.º tras la transfección. Cuanto mayor era la cantidad de 3-MA añadida, más células apoptóticas se observaban.

50 La figura 18 es un gráfico que muestra los resultados cuando se examinó el porcentaje de apoptosis a lo largo del tiempo en un grupo de células de control (ARNip revuelto), un grupo de células con GST- π KD (ARNip de GST- π), un grupo de células con GST- π KD + 3-MA 1 mM (ARNip de GST- π + 3-MA 1 mM) y un grupo de células con GST- π KD + 3-MA 5 mM (ARNip de GST- π + 3-MA 5 mM). Se encontró que había una inducción de apoptosis dependiente de la dosis de 3-MA adicional.

55 [Modos para llevar a cabo la invención]

La presente descripción se refiere a un agente o una composición para inducir apoptosis (a continuación en el presente documento, también denominado "agente inductor de apoptosis" o "composición inductora de apoptosis") que contiene como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia.

60 Cuando se usa en el presente documento, GST- π indica una enzima, codificada por el gen de GSTP1, que cataliza la conjugación de glutatión. GST- π está presente en diversos animales, incluyendo seres humanos, y su información de secuencia se conoce (por ejemplo, ser humano: NP_000843 (NM_000852), rata: NP_036709 (NM_012577), ratón: NP_038569 (NM_013541), etc. Los números indican números de registro de la base de datos del NCBI; los que están fuera de los paréntesis son números de secuencias de aminoácidos y los que están dentro de los paréntesis son números de secuencias de bases).

Puesto que existe una posibilidad de la aparición de una mutación de una secuencia génica o una secuencia de aminoácidos entre individuos biológicos que no altera la función fisiológica de una proteína, el gen de GST- π y GSTP1 en la presente invención no está limitado a una proteína o ácido nucleico que tenga la misma secuencia que las secuencias conocidas anteriores, y puede incluir los que tienen una secuencia que es diferente de la secuencia anterior en uno o más aminoácidos o bases, normalmente uno o unos pocos, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos o bases, pero tienen una función equivalente a la de GST- π conocida. La función específica de GST- π es tal como se describe más adelante.

En la presente memoria descriptiva, frases tales como "cuando se usa en el presente documento", "usado en el presente documento", "en la presente memoria descriptiva" y "descrito en el presente documento" significan, a menos que se especifique otra cosa, que la descripción tras ellas se aplica a toda la descripción descrita en la presente memoria descriptiva. Además, a menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y términos científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica.

Los ejemplos del "fármaco que suprime GST- π " usado en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, un fármaco que suprime la producción y/o actividad de GST- π y un fármaco que promueve la degradación y/o inactivación de GST- π . Los ejemplos del fármaco que suprime la producción de GST- π incluyen, pero no se limitan a, una molécula de iARN, ribozima, ácido nucleico antisentido o polinucleótido de quimera de ADN/ARN para ADN que codifica GST- π , o un vector que expresa el mismo.

Los ejemplos del fármaco que suprime la actividad de GST- π incluyen, pero no se limitan a, una sustancia que se une a GST- π tal como, por ejemplo, glutatión, un análogo de glutatión (por ejemplo, los descritos en los documentos WO 95/08563, WO 96/40205, WO 99/54346, Nakajima *et al.*, 2003, citado anteriormente, etc.), ketoprofeno (Takahashi y Niitsu, 1994 citados anteriormente), indometacina (Hall *et al.*, Cancer Res. 1989; 49 (22): 6265-8), ácido etacrínico, Pilocprost (Tew *et al.*, Cancer Res. 1988; 48 (13): 3622-5), un anticuerpo anti-GST- π y un mutante dominante negativo de GST- π . Estos fármacos o bien están disponibles comercialmente o bien pueden producirse apropiadamente basándose en técnicas conocidas.

El fármaco que suprime la producción o actividad de GST- π es preferiblemente una molécula de iARN, ribozima, ácido nucleico antisentido o polinucleótido de quimera de ADN/ARN para ADN que codifica GST- π , o un vector que expresa el mismo, en cuanto a alta especificidad y una baja posibilidad de efectos secundarios.

La supresión de GST- π puede determinarse mediante la expresión o actividad de GST- π en células que se suprimen en comparación con un caso en el que no se utiliza un agente supresor de GST- π . La expresión de GST- π puede evaluarse mediante cualquier técnica conocida; los ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, un método de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-GST- π , EIA, ELISA, IRA, IRMA, un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método inmunohistoquímico, un método inmunocitoquímico, un método de citometría de flujo, diversos métodos de hibridación utilizando un ácido nucleico que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica GST- π o un fragmento único de la misma, o un producto de transcripción (por ejemplo, ARNm) o producto de corte y empalme de dicho ácido nucleico, un método de transferencia de tipo Northern, un método de transferencia de tipo Southern y diversos métodos de PCR.

Además, la actividad de GST- π puede evaluarse analizando una actividad conocida de GST- π incluyendo, pero sin limitarse a, unión a una proteína tal como, por ejemplo, Raf-1 (en particular Raf-1 fosforilada) o EGFR (en particular EGFR fosforilado) por medio de cualquier método conocido tal como, por ejemplo, un método de inmunoprecipitación, un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método de análisis de masas, un método de precipitación o un método de resonancia de plasmón superficial (SPR).

Cuando se usa en el presente documento, la molécula de iARN indica cualquier molécula que provoque la interferencia de ARN, incluyendo, pero sin limitarse a, un ARN de dúplex tal como ARNip (ARN de interferencia pequeño), miARN (micro ARN), ARNhp (ARN en horquilla pequeño), ARNdd (ARN dirigido por ADN), ARNpi (ARN de interacción con Piwi) o ARNipar (ARNip asociado a repetición) y formas modificadas de los mismos. Estas moléculas de iARN pueden estar comercialmente disponibles o pueden diseñarse y prepararse basándose en información de secuencia conocida, etc.

Además, cuando se usa en el presente documento, el ácido nucleico antisentido incluye ARN, ADN, PNA o un complejo de los mismos.

Cuando se usa en el presente documento, el polinucleótido de quimera de ADN/ARN incluye, pero no se limita a, un polinucleótido bicatenario compuesto por ADN y ARN que inhibe la expresión de un gen diana descrito en, por ejemplo, el documento JP, A, 2003-219893.

Cuando se usa en el presente documento, la autofagia puede incluir macroautofagia, microautofagia, autofagia mediada por chaperonas, etc., pero normalmente significa macroautofagia. Por tanto, el término "autofagia" en la presente invención se refiere a "macroautofagia" a menos que se especifique otra cosa.

- Autofagia, que significa "devorarse a uno mismo", es uno de los mecanismos de degradación de proteínas intracelulares, y se encarga de la degradación y el reciclaje de proteínas dentro de una célula. Se observa autofagia en una amplia variedad de especies biológicas incluyendo levaduras y mamíferos y va acompañada generalmente por una serie de procesos que incluyen (a) formación de un PAS (sitio de ensamblaje de fagoforo), (b) elongación y extensión del fagoforo que rodea a una proteína que va a degradarse (membrana de aislamiento) y formación de un autofagosoma que encapsula la proteína que va a degradarse, (c) formación de un autolisosoma mediante fusión de un autofagosoma y un lisosoma, y (d) degradación de la proteína dentro del autolisosoma.
- Los procesos anteriores (a) a (c) implican factores relacionados con autofagia específicos. Con respecto a los factores relacionados con autofagia, la primera investigación se llevó a cabo con levaduras, y se han identificado un gran número, incluyendo ATG1 a ATG27, hasta la fecha (Klionsky *et al.*, Dev Cell. 2003; 5 (4): 539-45); la investigación con mamífero también ha avanzado, se han identificado una pluralidad de homólogos, y el mecanismo molecular central de la autofagia está quedando claro (Yang y Klionsky, Curr Opin Cell Biol. 2010; 22 (2): 124-31).
- Los ejemplos de factores relacionados con autofagia implicados en el mecanismo molecular central de la autofagia en mamíferos incluyen los implicados en la formación de PAS, tales como VMP1, TP53INP2, mAtg9, el complejo ULK (compuesto por ULK1, ULK2, mAtg13 y FIP200), el complejo PI3K (el complejo Atg14L compuesto por Beclin1, hVps34, p150, Ambra1 y Atg14L, y el complejo UVRAG compuesto por Beclin1, hVps34, p150, Bif-1 y UVRAG) y los implicados en la elongación del fagoforo tales como LC3-II y el complejo Atg12-Atg5-Atg16L.
- Por tanto, los ejemplos del fármaco que suprime la autofagia incluyen, pero no se limitan a, un fármaco que suprime la producción y/o actividad de un factor relacionado con autofagia tal como los descritos anteriormente y un fármaco para promover la degradación y/o inactivación de un factor relacionado con autofagia. Los ejemplos del fármaco que suprime la producción de un factor relacionado con autofagia incluyen una molécula de iARN, ribozima, ácido nucleico antisentido o polinucleótido de quimera de ADN/ARN para ADN que codifica un factor relacionado con autofagia, o un vector que expresa el mismo.
- Los ejemplos del fármaco que suprime la actividad de un factor relacionado con autofagia incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor de PI3K (por ejemplo, wortmanina, etc.), en particular un inhibidor de PI3K de clase III (por ejemplo, 3-MA (3-metiladenina), etc.), una sustancia que inhibe la fusión de un autofagosoma y un lisosoma (por ejemplo, bafilomicina A1, etc.), una sustancia que inhibe la degradación de proteínas en un autolisosoma (por ejemplo, cloroquina, leupeptina, etc.), una sustancia que se une a un factor relacionado con autofagia (por ejemplo, un anticuerpo para un factor relacionado con autofagia, etc.), y un mutante dominante negativo de un factor relacionado con autofagia. Estos fármacos están comercialmente disponibles o pueden producirse apropiadamente basándose en técnicas conocidas. En una realización de la presente descripción, el fármaco que suprime la autofagia no contiene GST- π y/o una variante funcional de la misma.
- Desde el punto de vista de una alta especificidad y pocos efectos secundarios, el fármaco que suprime la autofagia es preferiblemente una molécula de iARN, ribozima, ácido nucleico antisentido o polinucleótido de quimera de ADN/ARN para ADN que codifica un factor relacionado con autofagia, o un vector que expresa el mismo.
- La supresión de la autofagia puede determinarse observando que la autofagia se suprime en células en comparación con un caso en el que el agente supresor de la autofagia de la presente descripción no se utiliza. La inhibición de la autofagia puede evaluarse basándose en cualquier técnica conocida, ejemplos de las cuales incluyen, pero no se limitan a, detección de un autofagosoma mediante un método de microscopio electrónico, y detección de un marcador de autofagia (por ejemplo, Atg5, Atg12, LC3, en particular LC3-II, etc.). LC3-II puede detectarse, por ejemplo, pero sin limitarse a, usando un anticuerpo específico para LC3-II, o puede detectarse sometiendo una muestra a separación con electroforesis, etc., y luego detectando LC3-II, separado como una banda que es diferente de LC3-I, mediante un método de inmunotransferencia de tipo Western, etc., usando un anticuerpo que reacciona con LC3-II o tanto LC3-I como LC3-II. Además, debido a que LC3-I está dispersado dentro del citoplasma, mientras que LC3-II se localiza en una estructura específica de autofagia tal como una membrana de aislamiento, un autofagosoma o un autolisosoma, puede usarse la presencia o el número de señales similares a puntos que muestran estas estructuras, que se manifiestan mediante inmunotinción, etc., con un anticuerpo que reacciona con LC3-II (incluyendo un anticuerpo que reacciona con tanto LC3-I como LC3-II) como indicador para la autofagia.
- El fármaco que suprime GST- π y el fármaco que suprime la autofagia pueden estar contenidos en una única formulación o pueden estar contenidos por separado en dos o más formulaciones. En este último caso, cada formulación puede administrarse al mismo tiempo o puede administrarse con un intervalo de tiempo entre medias. Cuando se administran con un intervalo de tiempo entre medias, la formulación que contiene un fármaco que suprime GST- π puede administrarse antes que la formulación que contiene un fármaco que suprime la autofagia o puede administrarse posteriormente a la misma.
- La presente descripción también se refiere a un agente o una composición para inducir apoptosis (a continuación en el presente documento, también denominado "agente inductor de apoptosis" o "composición inductora de apoptosis")

en células en las que se suprime GST- π , conteniendo el agente o la composición como principio activo un fármaco que suprime la autofagia.

5 Cuando se usa en el presente documento, "GST- π que está suprimiéndose" incluye, por ejemplo, un estado en el que GST- π está suprimiéndose en células que expresan GST- π . Los ejemplos de un estado de este tipo incluyen un estado en el que un fármaco que suprime GST- π (por ejemplo, los descritos anteriormente, etc.) se ha administrado a células que expresan GST- π .

10 Si está expresándose o no GST- π en determinadas células o bien se conoce de la bibliografía o bien puede determinarse detectando realmente la expresión de GST- π en células. La expresión de GST- π puede detectarse mediante cualquier técnica conocida, incluyendo las descritas anteriormente.

15 El agente o la composición de la presente descripción puede ser uno para inducir apoptosis en células que tienen un KRAS mutado.

20 Cuando se usa en el presente documento, los ejemplos del KRAS mutado incluyen, pero no se limitan a, los que tienen una mutación que provoca activación constante de KRAS, tal como una mutación que inhibe la GTPasa endógena o una mutación que aumenta la tasa de intercambio de nucleótidos de guanina. Los ejemplos específicos de tal mutación incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una mutación en los aminoácidos 12, 13 y/o 61 en KRAS humano (que inhibe la GTPasa endógena) y una mutación en los aminoácidos 116 y/o 119 en KRAS humano (que aumenta la tasa de intercambio de nucleótidos de guanina) (Bos, Cancer Res. 1989; 49 (17): 4682-9, Levi *et al.*, Cancer Res. 1991; 51 (13): 3497-502). Por tanto, en una realización de la presente invención, el KRAS mutado puede ser un KRAS que tiene una mutación en al menos uno de los aminoácidos 12, 13, 61, 116 y 119 de KRAS humano. En una realización de la presente invención, el KRAS mutado tiene una mutación en el aminoácido 12 de KRAS humano. Además, en una realización de la presente invención, el KRAS mutado puede ser uno que induce la sobreexpresión de GST- π . Por tanto, las células que tienen KRAS mutado pueden presentar sobreexpresión de GST- π .

30 La detección de KRAS mutado puede llevarse a cabo usando cualquier técnica conocida. Los ejemplos de una técnica de este tipo incluyen, pero no se limitan a, hibridación selectiva por medio de una sonda de ácido nucleico específica para una secuencia de mutación específica, un método de escisión de apareamiento erróneo enzimático, secuenciación (Bos, 1989 citado anteriormente) y un método de PCRRFLP (Miyashita *et al.*, 2001 citado anteriormente).

35 Además, la detección de la expresión de GST- π puede llevarse a cabo usando cualquier técnica conocida, incluyendo las descritas anteriormente. Si está sobreexpresándose o no GST- π puede evaluarse, por ejemplo, comparando el grado de expresión de GST- π en células que tienen KRAS mutado con el grado de expresión de GST- π en el mismo tipo de células que tienen KRAS normal. En este caso, puede decirse que GST- π está sobreexpresándose si el grado de expresión de GST- π en células que tienen KRAS mutado excede del grado de expresión de GST- π en el mismo tipo de células que tienen KRAS normal.

45 La cantidad de principio activo formulado en el agente o la composición de la presente descripción puede ser una cantidad que induce apoptosis cuando se administra el agente o la composición. Además, es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que excede el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo se conoce o puede determinarse apropiadamente mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas, etc., o una prueba en un modelo animal tal como un ratón, una rata, un perro o un cerdo, y tales métodos de prueba los conoce bien un experto en la técnica. La inducción de la apoptosis puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas, por ejemplo, mediante detección de un fenómeno específico de apoptosis tal como fragmentación del ADN, unión de anexina V a la membrana celular, cambio en el potencial de membrana mitocondrial o activación de caspasa, o mediante tinción con TUNEL. La cantidad de principio activo formulado puede variar según la manera en la que el agente o la composición se administra. Por ejemplo, cuando se usa una pluralidad de unidades de la composición para una administración, la cantidad de principio activo que va a formularse en una unidad de la composición puede determinarse dividiendo la cantidad de principio activo necesario para una administración entre dicha pluralidad de unidades. El ajuste de una cantidad de formulación de este tipo puede llevarla a cabo apropiadamente un experto en la técnica.

60 La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir un agente o una composición para inducir apoptosis, comprendiendo el procedimiento formular como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia; el uso de un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia en la producción de un agente o una composición para inducir apoptosis; una combinación de un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia para su uso en la inducción de apoptosis; y un método de inducción de apoptosis que comprende administrar cantidades eficaces de fármaco que suprime GST- π y fármaco que suprime la autofagia.

65 La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir un agente o una composición para inducir apoptosis en células en las que se suprime GST- π , comprendiendo el procedimiento formular como principio

activo un fármaco que suprime la autofagia; el uso de un fármaco que suprime la autofagia en la producción de un agente o una composición para inducir apoptosis en células en las que se suprime GST- π ; un fármaco que suprime la autofagia para su uso en la inducción de la apoptosis en células en las que se suprime GST- π ; y un método de inducción de apoptosis en células en las que se suprime GST- π , comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un fármaco que suprime la autofagia.

El fármaco o la cantidad de formulación del mismo en el uso o procedimiento de producción mencionado anteriormente son tal como se describieron anteriormente. La formulación de cada fármaco puede llevarse a cabo según cualquier técnica conocida.

Todos los métodos anteriores para inducir apoptosis pueden ser o bien un método *in vitro* o bien un método *in vivo*. Además, los fármacos en los métodos son tal como se describieron anteriormente, y la cantidad eficaz de fármaco puede ser una cantidad que induce apoptosis en células a las que se administra. También es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que exceda el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo se conoce o puede determinarse apropiadamente mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas, etc., y un experto en la técnica conoce bien un método de prueba de este tipo. La inducción de la apoptosis puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas, incluyendo las descritas anteriormente. La cantidad eficaz anterior no es necesario que sea necesariamente una que induzca apoptosis en todas las células de una población de células a las que se administra el fármaco. Por ejemplo, la cantidad eficaz anterior puede ser una cantidad que induce apoptosis en, de la población de células, al menos el 1 % de las células, al menos el 2 %, al menos el 3 %, al menos el 4 %, al menos el 5 %, al menos el 6 %, al menos el 8 %, al menos el 10 %, al menos el 12 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, etc.

El agente inductor de apoptosis de la presente descripción puede inducir apoptosis eficazmente incluso en células que tienen una anomalía en la proliferación celular, etc., y es eficaz como componente de una composición farmacéutica. Por tanto, un aspecto de la presente descripción incluye una composición farmacéutica que contiene el agente inductor de apoptosis de la presente descripción.

La composición farmacéutica de la presente descripción es eficaz en el tratamiento de una enfermedad en la que hay apoptosis anómala en particular. Por tanto, una realización de la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad en la que hay apoptosis anómala, conteniendo la composición farmacéutica el agente inductor de apoptosis. Cuando se usa en el presente documento, los ejemplos de la enfermedad en la que hay apoptosis anómala incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad debida a proliferación celular anómala, una enfermedad debida a mutación de KRAS y una enfermedad debida a sobreexpresión de GST- π . Los ejemplos de la enfermedad debida a proliferación celular anómala incluyen, pero no se limitan a, un tumor benigno o maligno, hiperplasia, queloide, síndrome de Cushing, aldosteronismo primario, eritroplaquia, policitemia vera, leucoplasia, cicatriz hiperplásica, liquen plano y lentiginosis. Los ejemplos de la enfermedad debida a mutación de KRAS incluyen, pero no se limitan a, un tumor benigno o maligno (también denominado un cáncer o una neoplasia maligna). Los ejemplos de la enfermedad debida a sobreexpresión de GST- π incluyen, pero no se limitan a, un tumor benigno o maligno, en particular un tumor maligno resistente a fármacos (por ejemplo, resistente a un agente alquilante tal como melfalán o ciclofosfamida, un antibiótico antitumoral a base de antraciclina tal como adriamicina, un complejo de platino tal como cisplatino, etopósido, etc.). En una realización de la presente descripción, la enfermedad en la que hay apoptosis anómala es un cáncer.

Los ejemplos del cáncer en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, sarcomas tales como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, rhabdomioma, leiomioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangiosarcoma, sarcoma sinovial, condrosarcoma y osteosarcoma, carcinomas tales como tumor cerebral, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico, carcinoma duodenal, carcinoma de apéndice, carcinoma de colon, carcinoma rectal, carcinoma de hígado, carcinoma pancreático, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma de conducto biliar, carcinoma anal, carcinoma renal, carcinoma de uréter, carcinoma de vejiga, carcinoma de próstata, carcinoma de pene, carcinoma testicular, carcinoma uterino, carcinoma de ovario, carcinoma vulvar, carcinoma vaginal y carcinoma de piel y, además, leucemia y linfoma maligno. En la presente invención, "cáncer" incluye tumor maligno epitelial y tumor maligno no epitelial. El cáncer en la presente descripción puede estar presente en cualquier sitio del cuerpo, por ejemplo, el cerebro, la cabeza y el cuello, el tórax, las extremidades, el pulmón, el corazón, el timo, el esófago, el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon), el intestino grueso (colon, ciego, apéndice, recto), el hígado, el páncreas, la vesícula biliar, el ano, el riñón, el conducto urinario, la vejiga, la próstata, el pene, los testículos, el útero, el ovario, la vulva, la vagina, la piel, el músculo estriado, el músculo liso, la membrana sinovial, el cartílago, el hueso, el tiroides, la glándula suprarrenal, el peritoneo, el mesenterio, la médula ósea, la sangre, el sistema vascular, el sistema linfático tal como ganglios linfáticos, líquido linfático, etc.

En una realización de la presente descripción, el cáncer incluye células cancerosas que tienen el KRAS mutado definido anteriormente. En una realización de la presente descripción, el cáncer incluye células cancerosas que presentan proliferación independiente de hormonas o factores de crecimiento. En una realización de la presente descripción, el cáncer incluye células cancerosas que presentan sobreexpresión de GST- π . En una realización de la presente descripción, el cáncer es resistente a fármacos. En una realización de la presente descripción, el cáncer

tiene resistencia a un fármaco seleccionado del grupo que consiste en un agente alquilante tal como melfalán o ciclofosfamida, un antibiótico antitumoral a base de antraciclina tal como adriamicina, un complejo de platino tal como cisplatino, y etopósido. En una realización de la presente descripción, el cáncer tiene resistencia a un medicamento seleccionado del grupo que consiste en melfalán, ciclofosfamida, adriamicina, cisplatino y etopósido.

La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad en la que hay apoptosis anómala, conteniendo la composición como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia; a un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar una enfermedad en la que hay apoptosis anómala, comprendiendo el procedimiento formular como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia; al uso de un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia para la producción de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad en la que hay apoptosis anómala; a una combinación de un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia para su uso en el tratamiento de una enfermedad en la que hay apoptosis anómala; y a un método para tratar una enfermedad en la que hay apoptosis anómala, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica a un sujeto que lo requiere.

El fármaco, la cantidad de formulación y la enfermedad en la que hay apoptosis anómala en el procedimiento de producción o uso son tal como se describieron anteriormente. La formulación de cada fármaco puede llevarse a cabo según cualquier técnica conocida.

Los presentes inventores han aclarado ahora que GST- π se une a un receptor tirosina cinasa, que está en posición anterior de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR, en particular a su forma fosforilada, y a Raf, que es una molécula constituyente de la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, en particular a su forma fosforilada, inhibiendo así la ubiquitinación de estas moléculas, promoviendo se ese modo estas cascadas de señales. Por tanto, la presente descripción también se refiere a un agente o a una composición para promover la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK (también denominado "promotor de la cascada de señales" o "composición que promueve la cascada de señales"), conteniendo el agente o la composición como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma. En particular, el agente o la composición de la presente descripción puede promover tanto la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR como la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK al mismo tiempo.

Los ejemplos de la "variante funcional de GST- π " usada en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, (i) una variante que tiene una o más mutaciones, normalmente una o unas pocas, en la secuencia de aminoácidos de GST- π pero tiene todavía una función equivalente a GST- π , (ii) una variante que está codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia de bases de un gen que codifica GST- π o un ácido nucleico que tiene una o más mutaciones, normalmente una o unas pocas, en la secuencia de bases de un ácido nucleico que codifica el mismo polipéptido que se codificó mediante el ácido nucleico anterior, y tiene una función equivalente a GST- π , (iii) una variante que está codificada por un ácido nucleico que se hibrida, en condiciones rigurosas, con una hebra complementaria de un ácido nucleico que tiene una secuencia de bases de un gen que codifica GST- π , un ácido nucleico que codifica el mismo polipéptido que se codificó mediante el ácido nucleico anterior o un ácido nucleico que codifica una variante de (ii), o un fragmento de la hebra complementaria, y tiene una función equivalente a GST- π , (iv) una variante que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, aún más preferiblemente al menos el 90 % y de manera particularmente preferible al menos el 95 % con la secuencia de aminoácidos de GST- π , y tiene una función equivalente a GST- π , y (v) una variante que está codificada por un ácido nucleico que tiene una homología de al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, aún más preferiblemente al menos el 90 % y de manera particularmente preferible al menos el 95 % con la secuencia de bases del gen que codifica GST- π , y tiene una función equivalente a GST- π .

La secuencia de aminoácidos de GST- π y la secuencia de bases del gen que codifica GST- π se conocen para diversos tipos de animales tal como se describió anteriormente, y un experto en la técnica puede preparar apropiadamente las variantes funcionales mencionadas anteriormente basándose en la información de secuencia mediante cualquier técnica conocida, por ejemplo, síntesis química, escisión o inserción de un ácido nucleico mediante una enzima de restricción, mutagénesis dirigida al sitio, aplicación de radiación o rayos UV, etc.

Si una variante dada tiene o no una función equivalente a GST- π puede evaluarse analizando una función conocida de GST- π incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, unión con una proteína tal como Raf-1 (en particular Raf-1 fosforilada) o EGFR (en particular EGFR fosforilado) mediante cualquier método conocido tal como, por ejemplo, un método de inmunoprecipitación, un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método de análisis de masas, un método de precipitación o un método de resonancia de plasmón superficial (SPR), y comparándola con un control negativo apropiado o GST- π como control positivo. Por ejemplo, cuando la función de una variante dada es superior a un control negativo, por ejemplo, cuando es superior en al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 75 % o al menos el 100 % y/o cuando la función es al menos 1/100 de GST- π , al menos 1/50, al menos 1/25, al menos 1/10, al menos 1/5 o al menos 1/2, esta variante se incluye en las variantes funcionales de GST- π .

El término "condiciones rigurosas" usado en el presente documento es un parámetro conocido en este campo técnico y se describe en un protocolo convencional tal como, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Press (2001) o Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992).

Las condiciones rigurosas en la presente descripción significan, por ejemplo, hibridación a 65 °C por medio de un tampón de hibridación que contiene SSC 3,5x (cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7), Ficoll al 0,02 %, polivinilpirrolidona al 0,02 %, seroalbúmina bovina al 0,02 %, NaH₂PO₄ 25 mM (pH 7), SDS al 0,05 % y EDTA 2 mM. Tras la hibridación, se lava una membrana a la que se le ha transferido ADN con SSC 2x a temperatura ambiente, y luego con SSC de 0,1 a 0,5x/SDS 0,1x a una temperatura de hasta 68 °C. Alternativamente, la hibridación rigurosa puede llevarse a cabo usando un tampón de hibridación comercial tal como disolución de hibridación ExpressHyb^(R) (Clontech) en condiciones de hibridación y lavado descritas por el fabricante.

Hay otras condiciones, reactivos, etc. aplicables que pueden dar como resultado el mismo grado de rigurosidad, pero puesto que puede esperarse que un experto en la técnica esté familiarizado con tales condiciones, no se hace referencia específicamente a las mismas en el presente documento. Sin embargo, es posible manipular las condiciones con el fin de identificar claramente un ácido nucleico que codifica una variante de GST-π.

GST-π y/o una variante funcional de la misma en la presente descripción incluyen, además de GST-π y una variante funcional de la misma como proteínas, un ácido nucleico que codifica GST-π y un ácido nucleico que codifica una variante funcional de GST-π.

Cuando se usa en el presente documento, la "cascada de señales" significa la transducción de señales por medio de la cual una pluralidad de moléculas de señalización transmite una señal en secuencia. Por ejemplo, en el caso de la "cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR", se transmite una señal de una manera tal que PI3K se activa en primer lugar, esto provoca entonces que se active Akt, y esto provoca entonces que se active mTOR. Esto también se aplica en la notación de otras cascadas de señales. Con respecto a la relación entre posición anterior y posterior de la señalización, la cadena de activación puede estar provocada o bien directamente o bien indirectamente. Por ejemplo, se sabe que la activación de Akt provocada por PI3K está mediada por moléculas tales como PIP₃ ((3,4,5)trifosfato de fosfatidilinositol) y PDK1 (proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinosítido, también denominada PDPK1).

La cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR es una cascada de señales que está dirigida por la activación de PI3K y se sabe que está implicada en la señalización en supervivencia celular, etc. Los ejemplos del modo en el que se produce la activación de PI3K incluyen, pero no se limitan a, un ligando que se une a un receptor acoplado a proteína G o un receptor tirosina cinasa, y PI3K activada fosforila fosfolípido de inositol, produciendo por tanto un fosfatidilinositol tal como PIP₃. Este se une a PDK1 o Akt en un dominio PH, promoviendo por tanto la localización de estas proteínas en la membrana. PDK1 se une a PIP₃ para que se active por tanto en la membrana, y el PDK1 activado fosforila T en la posición 308 de Akt. La serina en la posición 473 de Akt se fosforila mediante mTORC2, que es uno de los complejos de mTOR, y Akt se activa completamente como resultado de la fosforilación de los aminoácidos en estas dos posiciones.

Aunque la ruta para la activación de mTOR por Akt no se ha dilucidado completamente, se cree que está implicado PRAS40 (sustrato de Akt/PKB rico en prolina de 40 kDa). PRAS40 es un sustrato de Akt como indica el nombre y es una molécula que se cree que se une a un complejo de mTOR para suprimir así su activación, y se cree que cuando se activa Akt se fosforila PRAS40, provocando de ese modo que se libere PRAS40 del complejo de mTOR para activar así mTOR. Cuando se activa mTOR, se fosforilan ULK1 y ULK2 (cinasa similar a unc-51) y mAtg13 (proteína 13 relacionada con autofagia de mamíferos), inhibiendo por tanto el inicio de la señalización de autofagia para suprimir por tanto la autofagia.

Por otro lado, la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK es una cascada de señales que se refiere a proliferación celular, etc. Cuando un ligando tal como, por ejemplo, un factor de crecimiento se une a un receptor acoplado a proteína G o un receptor tirosina cinasa, KRAS, que es una proteína G de bajo peso molecular, se activa, y la KRAS activada fosforila Raf (una clase de MAPKKK) para activarla, por tanto. La Raf activada activa MEK (MAPK/ERK cinasa, una clase de MAP2K), y la MEK activada activa ERK (cinasa regulada por señal extracelular, una clase de MAPK). La ERK activada se transloca al núcleo y promueve la transcripción de diversos ARNm para desencadenar por tanto la proliferación celular.

En la presente descripción, la promoción de una cascada de señales significa no solamente potenciar la activación de la cascada de señales sino también la supresión de la inactivación de la cascada de señales. Si una cascada de señales se promueve o no puede determinarse por la cascada de señales que se inactiva en comparación con un caso en el que el agente o la composición de la presente descripción no se utiliza. La activación de una cascada de señales puede evaluarse detectando, por ejemplo, pero sin limitarse a, un fenómeno celular que resulta de la activación de una molécula constituyente de la cascada de señales (por ejemplo, fosforilación, etc.) o la activación de una cascada de señales, tal como, por ejemplo, supresión de autofagia, etc., en el caso de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR o proliferación celular, etc., en el caso de la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK.

La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir un agente o una composición para promover la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular GST- π y/o una variante funcional de la misma; el uso de GST- π y/o una variante funcional de la misma en la producción de un agente o una composición para promover la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK; a GST- π y/o una variante funcional de la misma para su uso en la promoción de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK; y a un método para promover la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de GST- π y/o una variante funcional de la misma.

El agente o la composición para promover una cascada de señales de la presente descripción es útil para el tratamiento de una enfermedad asociada con una anomalía de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, en particular con una supresión de estas cascadas de señales. Los ejemplos de una enfermedad de este tipo incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad acompañada por supresión de la expresión o actividad y/o aumento en la degradación o inactivación de una molécula constituyente de estas cascadas de señales (por ejemplo, debido a una anomalía genética de estas moléculas, supresión de la expresión o actividad de GST- π , etc.).

Por tanto, la presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, conteniendo la composición farmacéutica como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma; a un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, incluyendo el procedimiento una etapa de formular GST- π y/o una variante funcional de la misma; al uso de GST- π y/o una variante funcional de la misma en la producción de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK; a GST- π y/o una variante funcional de la misma para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con supresión de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK; y a un método para tratar una enfermedad asociada con supresión de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de GST- π y/o una variante funcional de la misma.

La presente descripción también se refiere a un agente o una composición para suprimir la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK (también denominado "agente supresor de la cascada de señales" o "composición supresora de la cascada de señales"), conteniendo el agente o la composición como principio activo un fármaco que suprime GST- π .

En la presente descripción, la supresión de una cascada de señales significa no solamente inducir la inactivación de la cascada de señales sino también suprimir la activación de la cascada de señales. Si la cascada de señales se suprime o no puede determinarse mediante la cascada de señales que se suprime en comparación con un caso en el que el agente o la composición de la presente descripción no se utiliza. La supresión de una cascada de señales puede evaluarse detectando, por ejemplo, pero sin limitarse a, una reducción de la activación (por ejemplo, fosforilación, etc.) de una molécula constituyente de la cascada de señales o un fenómeno celular que resulta de la supresión de la cascada de señales, tal como, por ejemplo, aumento de la autofagia, etc., en el caso de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR o supresión de la proliferación celular, etc., en el caso de la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK.

La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir un agente o una composición para suprimir la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime GST- π ; al uso de un fármaco que suprime GST- π en la producción de un agente o una composición para suprimir la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK; a un fármaco que suprime GST- π para su uso en la supresión de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK; y a un método para suprimir la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un fármaco que suprime GST- π .

El agente o la composición para suprimir una cascada de señales de la presente descripción es útil para el tratamiento de una enfermedad asociada con una anomalía de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, en particular con la activación de estas cascadas de señales. Los ejemplos de una enfermedad de este tipo incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad asociada con un aumento en la expresión o actividad y/o supresión de la degradación o inactivación de una molécula constituyente de estas cascadas de señales (por ejemplo, debido a una anomalía genética de estas moléculas, un aumento en la expresión o actividad de GST- π) y una enfermedad asociada con la activación de la cascada de señales por medio de un factor distinto de una molécula constituyente de estas cascadas de señales (por ejemplo, activación de receptor tirosina cinasa, etc.).

Por tanto, la presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con la activación de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, conteniendo la composición farmacéutica como principio activo un fármaco que suprime GST- π ; a un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con la activación de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime GST- π ; al uso de un fármaco que suprime GST- π en la producción de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con la activación de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK; a un fármaco que suprime GST- π para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con la activación de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK; y a un método para tratar una enfermedad asociada con la activación de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un fármaco que suprime GST- π .

La presente descripción también se refiere a un agente o una composición para suprimir la ubiquitinación (también denominado "agente supresor de la ubiquitinación" o "composición supresora de la ubiquitinación"), conteniendo el agente o la composición como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma.

La ubiquitinación significa que la ubiquitina se une a una proteína y está implicada en el proceso de desechar una proteína que se vuelve innecesaria en una célula. Una proteína ubiquitinada se degrada en un proteasoma.

En una realización de la presente descripción, la proteína para la que se suprime la ubiquitinación es una proteína a la que puede unirse GST- π . Además, en una realización de la presente descripción, la proteína para la que se suprime la ubiquitinación se selecciona del grupo que consiste en una proteína que constituye la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, una proteína que constituye la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y un receptor tirosina cinasa. En una realización preferida de la presente descripción, la proteína para la que se suprime la ubiquitinación se selecciona del grupo que consiste en EGFR y Raf-1, en particular una forma fosforilada de las mismas.

En la presente descripción, la supresión de la ubiquitinación puede determinarse mediante la ubiquitinación que se suprime en comparación con un caso en el que el agente o la composición de la presente descripción no se utiliza. La supresión de la ubiquitinación puede evaluarse mediante cualquier técnica conocida, por ejemplo, pero sin limitarse a, un método de inmunoprecipitación, un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método de análisis de masas, un método de precipitación, etc.

La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir un agente o una composición para suprimir la ubiquitinación, comprendiendo el procedimiento una etapa de formulación de GST- π y/o una variante funcional de la misma; al uso de GST- π y/o una variante funcional de la misma en la producción de un agente o una composición para suprimir la ubiquitinación; a GST- π y/o una variante funcional de la misma para su uso en la supresión de la ubiquitinación; y a un método para suprimir la ubiquitinación, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de GST- π y/o una variante funcional de la misma.

El agente o la composición para suprimir la ubiquitinación de la presente descripción es útil en el tratamiento de una enfermedad asociada con hiperubiquitinación. Los ejemplos de una enfermedad de este tipo incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad acompañada por un aumento en la expresión o actividad y/o una supresión de la degradación o inactivación de ubiquitina ligasa (por ejemplo, debido a una anomalía genética de ubiquitina ligasa, supresión de expresión o actividad de GST- π , etc.).

Por tanto, la presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con hiperubiquitinación, conteniendo la composición farmacéutica como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma; a un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con hiperubiquitinación, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular GST- π y/o una variante funcional de la misma; al uso de GST- π y/o una variante funcional de la misma en la producción de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con hiperubiquitinación; a GST- π y/o una variante funcional de la misma para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con hiperubiquitinación; y a un método para tratar una enfermedad asociada con hiperubiquitinación, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de GST- π y/o una variante funcional de la misma.

La presente descripción también se refiere a un agente o una composición para promover la ubiquitinación (también denominado "agente promotor de la ubiquitinación" o "composición promotora de la ubiquitinación"), conteniendo el agente o la composición como principio activo un fármaco que suprime GST- π .

En una realización de la presente descripción, la proteína para la que se promueve la ubiquitinación es una proteína a la que puede unirse GST- π . Además, en una realización de la presente descripción, la proteína para la que se promueve la ubiquitinación se selecciona del grupo que consiste en una proteína que constituye la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK, una proteína que constituye la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y un receptor tirosina cinasa. En una realización preferida de la presente descripción, la proteína para la que se promueve la

ubiquitinación se selecciona del grupo que consiste en EGFR y Raf-1, en particular una forma fosforilada de las mismas.

5 En la presente descripción, la promoción de la ubiquitinación puede determinarse mediante la ubiquitinación que se promueve en comparación con un caso en el que el agente o la composición de la presente descripción no se utiliza. La promoción de la ubiquitinación puede evaluarse mediante cualquier técnica conocida, por ejemplo, pero sin limitarse a, un método de inmunoprecipitación, un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método de análisis de masas, un método de precipitación, etc.

10 La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir un agente o una composición para promover la ubiquitinación, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime GST- π ; al uso de un fármaco que suprime GST- π en la producción de un agente o una composición para promover la ubiquitinación; a un fármaco que suprime GST- π para su uso en la promoción de la ubiquitinación; y a un método para promover la ubiquitinación, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un fármaco que
15 suprime GST- π .

El agente o la composición para promover la ubiquitinación de la presente descripción es útil en el tratamiento de una enfermedad asociada con supresión de la ubiquitinación. Los ejemplos de una enfermedad de este tipo incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad asociada con supresión de la expresión o actividad y/o un aumento
20 en la degradación o inactivación de ubiquitina ligasa (por ejemplo, debido a una anomalía genética de ubiquitina ligasa, un aumento en la expresión o actividad de GST- π , etc.).

Por tanto, la presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de ubiquitinación, conteniendo la composición farmacéutica como principio activo un
25 fármaco que suprime GST- π ; a un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de la ubiquitinación, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime GST- π ; al uso de un fármaco que suprime GST- π en la producción de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de la ubiquitinación; a un fármaco que suprime
30 GST- π para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con supresión de la ubiquitinación; y a un método para tratar una enfermedad asociada con supresión de la ubiquitinación, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un fármaco que suprime GST- π .

La presente descripción también se refiere a un agente o una composición para suprimir la autofagia (también denominado "agente supresor de la autofagia" o "composición supresora de la autofagia"), conteniendo el agente o
35 la composición como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma. Los presentes inventores han aclarado ahora que GST- π se une a un receptor tirosina cinasa, en particular una forma fosforilada del mismo, que está en posición anterior de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR, para inhibir por tanto la ubiquitinación del mismo, promoviendo de ese modo la cascada de señales; se sabe que la activación de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR suprime la autofagia (por ejemplo, Yang y Klionsky, 2010 citado anteriormente).

40 En la presente descripción, la supresión de la autofagia puede determinarse mediante la autofagia que se suprime en células en comparación con un caso en el que el agente o la composición de la presente descripción no se utiliza. La técnica para evaluar la autofagia es tal como se describió anteriormente.

45 La presente descripción se refiere además a un procedimiento para producir un agente o una composición para suprimir la autofagia, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular GST- π y/o una variante funcional de la misma; al uso de GST- π y/o una variante funcional de la misma en la producción de un agente o una composición para suprimir la autofagia; a GST- π y/o una variante funcional de la misma para su uso en la supresión de la autofagia; y a un método para suprimir la autofagia, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de
50 GST- π y/o una variante funcional de la misma.

El agente o la composición para suprimir la autofagia de la presente descripción es útil para el tratamiento de una enfermedad asociada con autofagia potenciada. Los ejemplos de una enfermedad de este tipo incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad asociada con supresión de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR (por ejemplo, debido a una anomalía genética de una molécula constituyente de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o una molécula en posición anterior de la misma, supresión de la expresión o actividad de GST- π , etc.), miopatía, daño
55 hepático, daños por reperfusión, etc.

Por tanto, la presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con autofagia potenciada, conteniendo la composición farmacéutica como principio activo GST- π y/o una variante funcional de la misma; a un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con autofagia potenciada, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular GST- π y/o una variante funcional de la misma; al uso de GST- π y/o una variante funcional de la misma en la producción de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con autofagia potenciada; a GST- π y/o una variante
60 funcional de la misma para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con autofagia potenciada; y a un método para tratar una enfermedad asociada con autofagia potenciada, comprendiendo el método administrar una

cantidad eficaz de GST- π y/o una variante funcional de la misma a un sujeto que lo requiere.

Además, los presentes inventores han aclarado ahora que la autofagia se promociona suprimiendo GST- π . Por tanto, la presente descripción también se refiere a un agente o una composición para promover la autofagia (también denominado un "agente promotor de la autofagia" o una "composición promotora de la autofagia") que contiene como principio activo un fármaco que suprime GST- π . La presente descripción se refiere además a un procedimiento para producir un agente o una composición para promover la autofagia, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime GST- π ; al uso de un fármaco que suprime GST- π en la producción de un agente o una composición para promover la autofagia; a un fármaco que suprime GST- π para su uso en la promoción de la autofagia; y a un método para promover la autofagia, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un fármaco que suprime GST- π .

El agente o la composición para promover la autofagia de la presente descripción es útil en el tratamiento de una enfermedad asociada con supresión de la autofagia, etc. Los ejemplos de una enfermedad de este tipo incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad asociada con activación de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR (por ejemplo, debido a una anomalía genética de una molécula constituyente de la cascada de señales de PI3K/Akt/mTOR y/o una molécula en posición anterior de la misma, un aumento en la expresión o actividad de GST- π , etc.), envejecimiento y una enfermedad isquémica.

Por tanto, la presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de autofagia, conteniendo la composición farmacéutica como principio activo un fármaco que suprime GST- π ; a un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de la autofagia, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime GST- π ; al uso de un fármaco que suprime GST- π en la producción de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad asociada con supresión de la autofagia; a un fármaco que suprime GST- π para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con supresión de la autofagia; y a un método para tratar una enfermedad asociada con supresión de la autofagia, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un fármaco que suprime GST- π a un sujeto que lo requiere.

La cantidad de formulación del principio activo de los diversos tipos de agente o composición de la presente descripción relacionados con la supresión/promoción de una cascada de señales, ubiquitinación o autofagia puede ser una cantidad que logra un efecto deseado (es decir, supresión/promoción de la cascada de señales, ubiquitinación o autofagia) cuando se administra el agente o la composición. Además, es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que excede el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo se conoce o puede determinarse apropiadamente por medio de una prueba *in vitro* usando células cultivadas, etc., o una prueba en un animal modelo tal como un ratón, una rata, un perro, o un cerdo, y un método de prueba de este tipo lo conoce bien un experto en la técnica. La inhibición/promoción de una cascada de señales, ubiquitinación o autofagia puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas, incluyendo las descritas anteriormente. La cantidad de formulación de principio activo puede variar según el modo de administración del agente o la composición. Por ejemplo, cuando se usa una pluralidad de unidades de la composición para una administración, la cantidad de principio activo que va a formularse en una unidad de la composición puede ser una obtenida dividiendo la cantidad de principio activo necesaria para una administración entre dicha pluralidad de unidades. El ajuste de una cantidad de formulación de este tipo puede llevarla a cabo apropiadamente un experto en la técnica.

El fármaco y la cantidad de formulación del mismo en el procedimiento de producción o uso de los diversos tipos de agente o composición relacionados con la supresión/promoción de una cascada de señales, ubiquitinación o autofagia son tal como se describió anteriormente. La formulación de cada fármaco puede llevarse a cabo según cualquier técnica conocida.

Todos los diversos tipos de métodos relacionados con la supresión/promoción de una cascada de señales, ubiquitinación o autofagia pueden ser un método *in vitro* o un método *in vivo*. Además, la cantidad eficaz de fármaco en los métodos anteriores puede ser una cantidad que logra un efecto deseado (es decir, supresión/promoción de una cascada de señales, ubiquitinación o autofagia) en células a las que se administra. Además, es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que excede el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo se conoce o puede determinarse apropiadamente mediante una prueba *in vitro*, etc., usando células cultivadas, etc., y un método de prueba de este tipo lo conoce bien un experto en la técnica. El logro de un efecto deseado puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas, incluyendo las descritas anteriormente. No es necesario que la cantidad eficaz anterior sea necesariamente una que induzca un efecto deseado en todas las células de una población de células a la que se administra el fármaco. Por ejemplo, la cantidad eficaz anterior puede ser una cantidad que induce un efecto deseado en, de la población de células, al menos el 1 % de las células, al menos el 2 %, al menos el 3 %, al menos el 4 %, al menos el 5 %, al menos el 6 %, al menos el 8 %, al menos el 10 %, al menos el 12 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, etc.

Cuando el principio activo en los diversos agentes o composiciones, métodos de tratamiento, etc., de la presente invención descritos en el presente documento es un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido de quimera de ADN/ARN, etc., puede usarse como ácido

nucleico desnudo tal cual, pero puede portarse también mediante diversos vectores. Como vector, puede usarse cualquier vector conocido tal como un vector de plásmido, un vector de fago, un vector de fagómido, un vector de cósmido o un vector de virus. El vector contiene preferiblemente al menos un promotor que potencia la expresión del ácido nucleico portado, y en este caso el ácido nucleico preferiblemente está operativamente unido a un promotor de este tipo. El ácido nucleico que está operativamente unido a un promotor al que se hace referencia en el presente documento significa que el ácido nucleico y el promotor están situados de modo que se produce apropiadamente una proteína codificada por el ácido nucleico mediante la acción del promotor. El vector puede replicarse o no en una célula huésped, y la transcripción de un gen puede llevarse a cabo fuera del núcleo o dentro del núcleo de una célula huésped. En este último caso, el ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de una célula huésped.

Además, el principio activo puede estar transportado mediante diversos vehículos proteínicos o lipídicos no virales. Los ejemplos de tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, colesterol, un liposoma, un protómero de anticuerpo, nanopartículas de ciclodextrina, un péptido de fusión, un aptámero, un copolímero de poli(ácido láctico) biodegradable y polímero; la eficacia de incorporación en células puede potenciarse (véase, por ejemplo, Pirolo y Chang, *Cancer Res.* 2008; 68 (5): 1247-50, etc.). En particular, es útil un liposoma catiónico o un polímero (por ejemplo, polietilenimina, etc.). Los ejemplos adicionales de polímeros útiles como vehículo de este tipo incluyen los descritos en los documentos US 2008/0207553, US 2008/0312174, etc.

Con respecto a las diversas composiciones farmacéuticas de la presente invención descritas en el presente documento, el principio activo puede combinarse con otro componente opcional siempre que el efecto del principio activo no se vea alterado. Los ejemplos de un componente opcional de este tipo incluyen otro agente terapéutico químico, un vehículo farmacológicamente aceptable, un excipiente, un diluyente, etc. Además, dependiendo de la vía de administración, el modo de liberación del fármaco, etc., la composición puede recubrirse con un material apropiado tal como, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material de disgregación temporal, o puede incorporarse en un sistema de liberación de fármacos apropiado.

Los diversos agentes y composiciones (incluyendo las diversas composiciones farmacéuticas) de la presente invención descritos en el presente documento pueden administrarse por medio de diversas vías incluyendo vías tanto oral como parenteral, por ejemplo, sin limitación, vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intratumoral, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosa, transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intrapulmonar e intrauterina, y pueden formularse para dar una forma de dosificación adecuada para cada vía de administración. Con respecto a tales formas de dosificación y métodos de formulación, puede emplearse cualquier método o forma conocida apropiadamente (véase, por ejemplo, Hyojun yakuzaigaku (Standard Pharmaceutical Science), ed. por Yoshiteru Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003, etc.).

Los ejemplos de la forma de dosificación adecuada para administración oral incluyen, pero no se limitan a, un polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula, un líquido, una suspensión, una emulsión, un gel y un jarabe, y los ejemplos de la forma de dosificación adecuada para administración parenteral incluyen una inyección tal como una inyección de disolución, una inyección de suspensión, una inyección de emulsión o una inyección en una forma que se prepara en el momento de su uso. Una formulación para administración parenteral puede estar en forma de una suspensión o disolución estéril isotónica acuosa o no acuosa.

Los diversos agentes o composiciones (incluyendo diversas composiciones farmacéuticas) de la presente descripción descritos en el presente documento pueden dirigirse a un tejido o células específicas. El direccionamiento puede lograrse mediante cualquier técnica conocida. Cuando se intenta la administración a un cáncer, por ejemplo, sin limitación, puede usarse una técnica tal como direccionamiento pasivo en la que se prepara una formulación para dar un tamaño de 50 a 200 μm de diámetro, en particular de 75 a 150 μm , etc., que es adecuado para que presente un efecto de EPR (permeabilidad y retención potenciados), o direccionamiento activo en el que un ligando de CD19, HER2, un receptor de transferrina, un receptor de ácido fólico, un receptor de VIP, EGFR (Torchilin, *AAPS J.* 2007; 9 (2): E128-47), RAAG10 (documento JP, A (PCT) 2005-532050), PIPA (documento JP, A (PCT) 2006-506071) o KID3 (documento JP, A (PCT) 2007-529197), etc., un péptido que tiene un motivo de RGD o un motivo de NGR, F3, LyP-1 (Ruoslahti *et al.*, *J Cell Biol.* 2010; 188 (6): 759-68), etc., se usa como agente de direccionamiento. Además, puesto que se sabe que el retinoide es útil como agente de direccionamiento para células cancerosas (documento WO 2008/120815), también puede usarse un vehículo que contiene un retinoide como agente de direccionamiento. Tales vehículos se describieron en la bibliografía anteriormente, así como en los documentos WO 2009/036368, WO 2010/014117, etc.

Los diversos agentes o composiciones (incluyendo diversas composiciones farmacéuticas) de la presente invención descritos en el presente documento pueden suministrarse en cualquier forma, y desde el punto de vista de la estabilidad en almacenamiento, pueden proporcionarse en una forma que puede prepararse en el momento de uso, por ejemplo, una forma que permite que un médico y/o farmacéutico, una enfermera, otro paramédico, etc., lo preparen en el sitio médico o sus proximidades. Una forma de este tipo es particularmente útil cuando el agente o la composición de la presente invención contiene un componente que es difícil de almacenar de manera estable, tal como un líquido, una proteína o un ácido nucleico. En este caso, el agente o la composición de la presente invención se proporciona en uno o más recipientes que contienen al menos uno de los constituyentes esenciales, y la preparación se lleva a cabo antes de su uso, por ejemplo, en el plazo de 24 horas, preferiblemente en el plazo de 3

horas, y de manera más preferible inmediatamente antes de su uso. Cuando se lleva a cabo la preparación, puede usarse un reactivo, un disolvente, equipo de preparación, etc., que están disponibles habitualmente en el lugar de la preparación según sea apropiado.

5 Por tanto, la presente descripción también se refiere a un kit para preparar una composición, conteniendo el kit uno o más recipientes, conteniendo el recipiente individualmente o en combinación principios activos que van a estar contenidos en los diversos agentes o composiciones de la presente descripción y constituyentes esenciales de los diversos agentes o composiciones proporcionadas en forma de un kit de este tipo. El kit de la presente descripción puede incluir, además de lo anterior, instrucciones tales como una explicación escrita o un medio de grabación electrónica tal como un CD o DVD que describe un método de preparación, un método de administración, etc., para los diversos agentes o composiciones de la presente descripción. Además, el kit de la presente descripción puede contener todos los constituyentes para completar los diversos agentes o composiciones de la presente descripción, pero no es necesario que contenga necesariamente todos los constituyentes. Por tanto, no es necesario que el kit de la presente descripción contenga un reactivo o un disolvente que está disponible habitualmente en un sitio médico, un laboratorio experimental, etc., tal como agua estéril, solución salina fisiológica o una disolución de glucosa.

La cantidad eficaz de los diversos métodos de tratamiento de la presente descripción descrita en el presente documento es por ejemplo una cantidad que reduce los síntomas de una enfermedad o retrasa o detiene el progreso de una enfermedad, y es preferiblemente una cantidad que suprime o cura una enfermedad. También es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que excede el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo puede determinarse apropiadamente mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas, etc., o una prueba en un animal modelo tal como un ratón, una rata, un perro o un cerdo, y tales métodos de prueba los conoce bien un experto en la técnica. Además, la dosis de un fármaco usado en el método de tratamiento de la presente descripción lo conoce un experto en la técnica o puede determinarse apropiadamente mediante las pruebas descritas anteriormente, etc.

La dosis específica del principio activo que va a administrarse en el método de tratamiento de la presente descripción descrita en el presente documento puede determinarse teniendo en consideración diversas condiciones relacionadas con el sujeto que requiere tratamiento, tal como, por ejemplo, la gravedad de los síntomas, el estado de salud general del sujeto, la edad, el peso corporal, el género del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de administración, los productos farmacéuticos simultáneos, la sensibilidad al tratamiento, la forma de dosificación y el cumplimiento del tratamiento.

Los ejemplos de la vía de administración incluyen diversas vías, incluyendo vías tanto oral como parenteral, tales como vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intratumoral, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosa, transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intrapulmonar e intrauterina.

La frecuencia de administración depende de las propiedades del agente o la composición usada y el estado del sujeto, incluyendo los descritos anteriormente, y puede ser una pluralidad de veces al día (es decir, dos, tres, cuatro, cinco o más veces al día), una vez al día, cada pocos días (es decir, cada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete días, etc.), cada semana, cada pocas semanas (es decir, cada dos, tres, cuatro semanas, etc.), etc.

Cuando se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa cualquier individuo biológico y es preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero, y aún más preferiblemente un individuo humano. En la presente invención, el sujeto puede estar o bien sano o bien afectado por alguna enfermedad, pero cuando se hace un intento de tratar una enfermedad específica, significa normalmente un sujeto afectado por una enfermedad de este tipo o que corre el riesgo de verse afectado.

Además, cuando se usa en el presente documento, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervenciones preventivas y/o terapéuticas médicamente permitidas para el fin de curado, remisión temporal, prevención, etc., de una enfermedad. Por ejemplo, el término "tratamiento" incluye intervenciones médicamente permisibles para diversos tipos de fines incluyendo retraso o detención del progreso de una enfermedad, realizar una regresión o desaparición de una lesión, prevenir el inicio o inhibir la reparación.

55 Ejemplos

La presente invención se explica adicionalmente a continuación basándose en los ejemplos, pero tales ejemplos son únicamente ilustraciones de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos de la presente invención.

60 Ejemplo 1: Efecto de la desactivación de GST- π sobre la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK

(1) Cultivo celular

65 Se cultivó la línea celular de carcinoma de colon positiva para mutación de K-RAS M7609 en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % a 37 °C bajo una atmósfera que contenía el 5 % de CO₂. Además, se

añadieron penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml como antibióticos al medio.

(2) Transfección de ARNip de GST-π

5 El día antes de la transfección, se sembraron en placa células M7609 en una placa de cultivo tisular de 100 mm usando medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10 % que no contenía antibiótico para dar 1×10^6 células/10 ml. Se añadieron 600 pmol de ARNip de GST-π (SEQ ID No: 1: GGGAGGCAAGACCUUCAUUTT, ID de ARNip n.º 2385, Ambion) a 1 ml de medio reducido en suero Opti-MEM I (GIBCO) y se mezcló suavemente. Se diluyeron posteriormente 35 µl de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) en 1 ml de medio reducido en suero Opti-MEM I y se mezcló suavemente. El ARNip de GST-π diluido y la Lipofectamine RNAiMAX diluida se combinaron y mezclaron suavemente, y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Durante este tiempo, se reemplazó el medio por 10 ml de medio reducido en suero Opti-MEM I. Tras los 10 min de incubación, se añadió el complejo entre ARNip de GST-π y Lipofectamine RNAiMAX a las células y se incubó a 37 °C bajo una atmósfera que contenía el 5 % de CO₂. Tras 5 horas de incubación, se reemplazó por 10 ml de medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10 % que no contenía antibiótico. Como experimento de control, se repitió el mismo procedimiento usando ARNip revuelto (SEQ ID No: 2: CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUGCAG, Hokkaido System Science Co., Ltd.). Los días 1.º, 2.º, 3.º y 4.º tras la transfección con ARNip de GST-π, se contó el número de células, y se examinó la desactivación de GST-π. Se analizó la desactivación de GST-π mediante un método de inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe a continuación.

(3) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la desactivación de GST-π

Se llevó a cabo análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la desactivación de GST-π usando células recogidas en cada uno de los puntos de tiempo mencionados anteriormente tras la transfección con ARNip de GST-π. Se cultivaron las células recogidas durante 16 horas en un medio libre de suero. Tras lavarse las células con PBS frío, se añadió a lo mismo tampón de lisis frío (NP-40 al 1 %, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Mini EDTA-libre completo (Roche), PhosSTOP (Roche), pH 7,5), y se llevó a cabo la solubilización incubando durante 30 min mientras se enfriaba con hielo. Se llevó a cabo la centrifugación a 4 °C y 15000 rpm durante 15 min., dando por tanto un extracto celular. Se sometió el extracto celular así obtenido a análisis de proteínas cuantitativo usando un kit de ensayo de proteína Micro BCA (Thermo SCIENTIFIC) (transflectante de ARNip de GST-π: 4,35 µg/µl, transflectante de ARNip revuelto: 4,56 µg/µl). Posteriormente, se desnaturalizaron 20 µg del extracto celular en condiciones reductoras, y se separó la proteína llevando a cabo SDS-PAGE usando multi gel II Mini 4/20 (13W) (Cosmo Bio Co., Ltd.). Tras completarse la SDS-PAGE, se llevó a cabo la transferencia a una membrana de PVDF eléctricamente usando un sistema de transferencia de tipo tanque. Se bloqueó la membrana de transferencia incubando con leche desnatada al 5 %/Tween20 al 0,05 % en PBS (abreviado a PBS-T) a 4 °C durante 16 horas. Posteriormente, se llevó a cabo una reacción con anticuerpo anti-GST-π diluido con PBS-T (MBL) a 4 °C durante 16 horas. Se llevó a cabo una reacción de anticuerpo secundario usando anticuerpo de conejo marcado con peroxidasa del rábano (HRP) a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces se llevó a cabo una reacción con un sustrato quimioluminiscente a temperatura ambiente durante 1 min., y luego se detectó esta quimioluminiscencia usando una película de rayos X. Se llevó a cabo el lavado entre operaciones tres veces mediante agitación durante 5 min usando PBS-T. Además, tras la transfección con ARNip, se llevó a cabo la siembra en placa sobre una placa de cultivo tisular de plástico de 60 mm para dar $1,0 \times 10^5$ células/5 ml, y se midió el recuento de células total en la placa usando un hemocitómetro hasta el 4.º día.

(4) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la proteína implicada en la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK

Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para la proteína principal implicada en la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK del mismo modo que para (3) anterior usando células recogidas el 2.º día tras la transfección con ARNip de GST-π. Como anticuerpos, además de anticuerpo anti-GST-π, se usaron anticuerpo anti-p-Raf-1 (Ser338) (MILLIPORE), anticuerpo anti-Raf-1 (Santa Cruz), anticuerpo anti-p-MEK1/2 (Ser217/221) (Cell Signaling), anticuerpo anti-MEK1/2 (Cell Signaling), anticuerpo anti-p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling), anticuerpo anti-ERK (Cell Signaling) y anticuerpo anti-GAPDH (Abcam).

55 Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2. En la figura 1 a), se observó que la expresión de GST-π se suprimía mediante ARNip de GST-π, pero no se suprimía mediante ARNip revuelto. En la figura 1 b), se encontró que incluso en el punto de tiempo cuando habían transcurrido 4 días tras la transfección, la expresión de GST-π se suprimía todavía de manera estable mediante ARNip de GST-π y, además, en el caso de que se suprima la expresión de GST-π, el número de células tras cultivar durante 4 días era notablemente menor que en el caso de ausencia de supresión. Además, también era evidente a partir de la figura 2 que en el grupo tratado con ARNip de GST-π, la fosforilación de todas las proteínas implicadas en la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK disminuyó en comparación con el grupo tratado con ARNip revuelto. Queda por tanto claro que, debido a la supresión de la expresión de GST-π, se suprimieron la cascada de señales de RAS/Raf/MAPK y la anomalía de proliferación celular.

65 Ejemplo 2: Efecto de la desactivación de GST-π sobre la ubiquitinación

(1) Efecto de la desactivación de GST- π sobre la ubiquitinación de Raf-1

Se llevaron a cabo el cultivo de células M7609 y la transfección con ARNip de GST- π según los procedimientos del ejemplo 1 (1) y (2).

Del mismo modo que para el ejemplo 1 (3), el 2.º día tras la transfección de ARNip se llevó a cabo el cultivo durante 16 horas en un medio libre de suero, y se recogió un extracto celular. Se sometió el extracto celular así obtenido a análisis de proteínas cuantitativo usando un kit de ensayo de proteínas Micro BCA (ARNip revuelto: 8,88 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ARNip de GST- π : 7,18 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se mezclaron 0,5 μg del extracto celular con anticuerpo anti-Raf-1 conjugado con proteína G Dynabeads (Invitrogen), se llevó a cabo la incubación a 4 °C durante 2 horas mientras se mezclaba suavemente en un agitador para aislar así proteína Raf-1, y entonces se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia de tipo Western del mismo modo que para el ejemplo 1 (3) usando un anticuerpo anti-ubiquitina (Santa Cruz). Se investigó la modificación de la fosforilación de Ser621, que está implicada en la inhibición de la degradación de Raf-1 por el proteasoma, de la misma manera usando un anticuerpo anti-p-Raf-1 (Ser621) (MILLIPORE).

(2) Efecto del inhibidor del proteosoma sobre la expresión de Raf-1 con desactivación de GST- π

Se llevaron a cabo el cultivo de células M7609 y la transfección con ARNip de GST- π según los procedimientos del ejemplo 1 (1) y (2). El 2.º día tras la transfección de ARNip de GST- π , se llevó a cabo el cultivo durante 16 horas en un medio libre de suero. Tras tratar con MG132 5 μM durante 4 horas, se recogió un extracto celular. Como control para el tratamiento con MG132, se llevó a cabo el tratamiento con DMSO al 0,05 % de la misma manera. Se sometió el extracto celular así obtenido a análisis de proteínas cuantitativo usando un kit de ensayo de proteínas Micro BCA Protein (grupo tratado con ARNip revuelto-DMSO: 3,36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, grupo tratado con ARNip revuelto-MG132: 3,16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, grupo tratado con ARNip de GST- π -DMSO: 3,12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, grupo tratado con ARNip de GST- π -MG132: 3,16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Se sometieron 20 μg del extracto celular a SDS-PAGE, y luego se llevó a cabo análisis de inmunotransferencia de tipo Western del mismo modo que para el ejemplo 1 (3) usando un anticuerpo anti-p-Raf-1 (Ser338) y un anticuerpo anti-Raf-1.

(3) Coinmunoprecipitación de p-Raf-1 y GST- π

Se llevó a cabo el cultivo de células M7609 según el procedimiento del ejemplo 1 (1). Posteriormente, después de que las células con GST- π desactivada obtenidas mediante el procedimiento del ejemplo 1 (2) se lavaran con PBS frío, se añadió un tampón de coinmunoprecipitación frío (NP-40 al 0,5 %, HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Mini EDTA-libre completo, PhosSTOP, pH 7,5), y se llevó a cabo la solubilización incubando durante 30 min mientras se enfriaba con hielo. Se llevó a cabo la centrifugación a 4 °C y 15000 rpm durante 15 min., dando por tanto un extracto celular. Se sometió el extracto celular así obtenido a análisis de proteínas cuantitativo usando un kit de ensayo de proteínas Micro BCA (12,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Se mezcló 1 mg del extracto celular con anticuerpo anti-p-Raf-1 (Ser338) (US Biological) conjugado con proteína G Dynabeads, y se llevó a cabo la incubación a 4 °C durante 16 horas mientras se mezclaba suavemente en un agitador, llevando a cabo por tanto la coinmunoprecipitación. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo anti-GST- π .

Los resultados se muestran en las figuras 3 a 5. Quedaba claro a partir de la figura 3 que en el grupo tratado con ARNip de GST- π la cantidad de ubiquitina coprecipitada con Raf-1 era grande en comparación con el grupo tratado con ARNip revuelto, y se potenció la ubiquitinación de Raf-1. Además, puede observarse a partir de la figura 4 que el proteasoma estaba implicado en la reducción de la expresión de p-Raf-1 por ARNip de GST- π , y puede observarse a partir de la figura 5 que GST- π estaba unido a p-Raf-1. Los resultados anteriores sugieren que GST- π se une a p-Raf-1 para inhibir por tanto su ubiquitinación, y debido a la supresión de GST- π , se promueve la ubiquitinación de p-Raf-1, y se reduce la abundancia de p-Raf-1.

Ejemplo 3: Análisis de inducción de autofagia y apoptosis mediante desactivación de GST- π

(1) Análisis de inducción de autofagia mediante tinción de inmunofluorescencia

Se analizó la inducción de autofagia mediante desactivación de GST- π mediante tinción de inmunofluorescencia con LC3, que es una proteína marcador específica de autofagia. Se sembraron en placa células con desactivación de GST- π obtenidas mediante el procedimiento del ejemplo 1 (2) sobre un cubreobjetos colocado en una placa de cultivo tisular de plástico de 35 mm para dar 1 x 10⁵ células/2 ml. Tras aspirarse el medio, se añadió paraformaldehído al 4 % en PBS, y se llevó a cabo la incubación a temperatura ambiente durante 10 min, fijando por tanto las células. Se llevó a cabo la permeabilización de las células usando Triton X-100 al 0,5 % en PBS sobre hielo durante 5 min. Tras lavar con PBS frío durante 10 min, se llevó a cabo una reacción con anticuerpo anti-LC3B (Invitrogen) diluido con PBS que contenía BSA al 1 % dentro de una cámara de humedad a 37 °C durante 1 hora. Se llevó a cabo una reacción de anticuerpo secundario usando anticuerpo de conejo marcado con Alexa Fluor488 (Invitrogen) a 37 °C durante 1 hora. Se llevó a cabo el montaje sobre un portaobjetos de vidrio usando un reactivo

antidesvanecimiento Prolong Gold con DAPI, y se llevó a cabo la incubación a 4 °C durante 16 horas. Se llevó a cabo el lavado tras la reacción de los anticuerpos tres veces usando PBS a 37 °C durante 5 min. Se definieron las células positivas para autofagia en el momento del examen con un microscopio de fluorescencia como las células que tenían una señal de LC3 similar a un punto presente en el citoplasma.

5

(2) Análisis de inducción de autofagia mediante inmunotransferencia de tipo Western

Se analizó adicionalmente la inducción de autofagia en células con GST- π desactivada mediante un análisis de inmunotransferencia de tipo Western de LC3. Se sembraron en placa células con GST- π desactivada obtenidas mediante el procedimiento del ejemplo 1 (2) sobre un cubreobjetos colocado en una placa de cultivo tisular de plástico de 35 mm para dar 1×10^5 células/2 ml. Tras incubar durante un tiempo predeterminado, se recogió un extracto celular y se sometió a análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se llevó a cabo una reacción con una membrana de transferencia a 4 °C durante 16 horas usando anticuerpo anti-LC3B (SIGMA) como anticuerpo primario. Se llevó a cabo la detección de moléculas de LC3 usando un reactivo quimioluminiscente tras una reacción con anticuerpo secundario marcado con HRP. Si se indujo autofagia o no se evaluó mediante un desplazamiento de LC3 de tipo I (18 kDa) a tipo II (16 kDa).

10

15

(3) Análisis de inducción de autofagia mediante examen con microscopio electrónico

El 1.º día tras la transfección de ARNip en el ejemplo 1 (2), se sembraron en placa las células sobre un portaobjetos de cultivo de 8 pocillos para cultivo tisular para dar $0,4 \times 10^5$ células/0,5 ml. Se llevó a cabo fijación usando glutaraldehído al 2,5 % en tampón de ácido cacodílico 0,1 M (pH 7,4) durante 1 hora, y tras enjuagar con tampón de ácido cacodílico 0,1 M se llevó a cabo la fijación posterior usando OsO4 al 1 % y ferrocianuro de potasio al 1,5 % durante 2 horas. Tras llevarse a cabo la deshidratación tres veces con etanol durante 10 min, se llevó a cabo la incrustación en una resina epoxídica (TAAB Laboratories Equipment). Se preparó una sección ultrafina usando una cuchilla de diamante, se llevó a cabo la tinción electrónica usando acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinó la sección usando un microscopio electrónico (microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7500, Hitachi High-Technologies Corporation).

20

25

(4) Análisis de inducción de apoptosis mediante tinción TUNEL

Se llevó a cabo un método de TUNEL tal como sigue usando un kit de detección de muerte celular *in situ*, POD (Roche). Se sembraron en placa células con GST- π desactivada obtenidas mediante el procedimiento del ejemplo 1 (2) sobre un cubreobjetos colocado en una placa de cultivo tisular de plástico de 35 mm para dar 1×10^5 células/2 ml. Tras aspirarse el medio, se añadió paraformaldehído al 4 % en PBS, y se llevó a cabo la incubación a temperatura ambiente durante 60 min, fijando por tanto las células. Con el fin de llevar a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena, se llevó a cabo la incubación con H₂O₂ al 3 % en metanol a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se llevó a cabo la permeabilización de las células mediante tratamiento con Triton X-100 al 0,1 % en citrato de sodio al 0,1 % sobre hielo durante 2 min. Se llevó a cabo la reacción de TUNEL en una cámara de humedad a 37 °C durante 60 min. Se llevó a cabo la detección de células positivas para TUNEL mediante una reacción de coloración usando un sustrato de DAB tras hacer reaccionar un anticuerpo anti-fluoresceína marcado con peroxidasa a 37 °C durante 30 min. Se llevó a cabo la contratinción usando hematoxilina, se examinaron las células teñidas bajo un microscopio óptico y se evaluaron las células positivas para TUNEL como células apoptóticas. Se llevó a cabo el lavado entre las operaciones aclarando con PBS.

35

40

45

Los resultados se muestran en las figuras 6 a 10. La figura 6 es una imagen de tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-LC3, y en las células mostradas mediante flechas se observó una señal similar a un punto que muestra LC3. Puesto que esta señal de LC3 similar a un punto sería un autofagosoma, puede observarse que en las células con GST- π desactivada se indujo autofagia.

50

La figura 7 muestra imágenes del examen con microscopio electrónico de las células con GST- π KD 2 días tras la transfección de ARNip de GST- π . La imagen a mano derecha es una ampliación de la parte A rodeada por un recuadro en la imagen a mano izquierda. En la imagen a mano derecha, puede observarse que en las partes mostradas mediante flechas, se formó un autofagosoma que rodeaba la mitocondria.

55

La figura 8 muestra los resultados de la inmunotransferencia de tipo Western de LC3. Hay dos tipos de proteína LC3 que reconoce un anticuerpo anti-LC3. Cuando se produce autofagia y se incorpora LC3 en una membrana lipídica doble, LC3 cambia del tipo I al tipo II. Por tanto, es posible confirmar si se ha inducido o no autofagia a partir de un cambio en la cantidad de LC3 de tipo II detectada. A partir del resultado de la figura 8, puede observarse que en el grupo tratado con ARNip de GST- π , se indujo la expresión de LC3 tanto de tipo I como de tipo II y el tipo II estaba notablemente aumentado, mientras que en el grupo tratado con ARNip revuelto, la expresión era baja para tanto el tipo I como el tipo II y el nivel de expresión del tipo I era inferior al del tipo II.

60

A partir de estos resultados, puede observarse que se induce autofagia suprimiendo la expresión de GST- π .

65

La figura 9 muestra el resultado de tinción TUNEL. La fila superior muestra imágenes del grupo tratado con ARNip

revuelto, la fila inferior muestra imágenes del grupo tratado con ARNip de GST- π ; en las células en las que se desactivó GST- π , se observaron células positivas para TUNEL, es decir, apoptosis.

5 La figura 10 es un gráfico que muestra el cambio a lo largo del tiempo de las proporciones de células positivas para autofagia y células positivas para apoptosis en el grupo tratado con ARNip de GST- π y el grupo tratado con ARNip revuelto. La proporción de células positivas para autofagia indica la proporción de células que tienen una señal de LC3 similar a un punto por 500 células en el experimento de tinción de inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-LC3 en (1) anterior, y la proporción de células positivas para apoptosis indica la proporción de células positivas para TUNEL por 1000 células en el experimento de tinción TUNEL en (4) anterior. Puede observarse a partir de esto
10 que la proporción de células positivas para autofagia aumentó rápidamente tras el tratamiento, alcanzó un pico el 2.º día y luego disminuyó, mientras que la proporción de células positivas para apoptosis aumentó de manera gradual pero continua hasta el 4.º día.

15 Ejemplo 4: Efecto de la desactivación de GST- π sobre la cascada de señales de EGFR/PI3K/Akt/mTOR

(1) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la señal de EGFR/PI3K/Akt/mTOR

Se analizó la expresión de cada proteína que constituye la cascada de señales de EGFR/PI3K/Akt/mTOR del mismo modo que para el ejemplo 1 (1), (2) y (4) excepto porque, como anticuerpos primarios, se usaron anticuerpo anti-p-EGFR (Tyr1068) (Cell Signaling), anticuerpo anti-EGFR (Santa Cruz), anticuerpo anti-p-PI3K p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) (Cell Signaling), anticuerpo anti-PI3K, p85 (MILLIPORE), anticuerpo anti-p-Akt (Ser473) (Cell Signaling), anticuerpo anti-Akt (Cell Signaling), anticuerpo anti-p-p70S6K (Thr389) (Cell Signaling), anticuerpo anti-p-p70S6K (Thr421/Ser424) (Cell Signaling) y anticuerpo anti-p70S6K (Cell Signaling).

25 (2) Efecto del inhibidor del proteosoma sobre la expresión de p-EGFR con desactivación de GST- π

Se llevaron a cabo el cultivo de células M7609 y la transfección con ARNip de GST- π según los procedimientos del ejemplo 1 (1) y (2). El 2.º día tras la transfección con ARNip de GST- π , se cultivaron las células en medio libre de suero durante 16 horas. Tras el tratamiento con MG132 5 μ M durante 2 horas, se recogió un extracto celular. Como control para el tratamiento con MG132, se llevó a cabo tratamiento con DMSO al 0,05 % de la misma manera. Se sometió el extracto celular así obtenido a análisis de proteínas cuantitativo usando un kit de ensayo de proteínas Micro BCA (grupo tratado con ARNip revuelto-DMSO: 11,98 μ g/ μ l, grupo tratado con ARNip revuelto-MG132: 12,29 μ g/ μ l, grupo tratado con ARNip de GST- π -DMSO: 8,91 μ g/ μ l, grupo tratado con ARNip de GST- π -MG132: 9,24 μ g/ μ l). Tras someterse 80 μ g del extracto celular a SDS-PAGE, se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo anti-p-EGFR (Tyr1068) y anticuerpo anti-EGFR.

(3) Coimmunoprecipitación de p-EGFR y GST- π

Se llevó a cabo el cultivo de las células M7609 según el procedimiento del ejemplo 1 (1). Posteriormente, tras lavarse las células con PBS frío, se añadió un tampón de coimmunoprecipitación frío (Triton X-100 al 1,0 %, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Mini EDTA-libre completo, PhosSTOP, pH 7,5), y se llevó a cabo la solubilización incubando durante 30 min mientras se enfriaba con hielo. Se llevó a cabo la centrifugación a 4 °C y 12000 rpm durante 10 min, dando por tanto un extracto celular. Se sometió el extracto celular así obtenido a análisis de proteínas cuantitativo usando un kit de ensayo de proteínas Micro BCA (9,08 μ g/ μ l). Se mezcló 1 mg del extracto celular con anticuerpo anti-p-EGFR (Tyr1068) (Calbiochem) conjugado con proteína G Dynabeads, y se llevó a cabo la coimmunoprecipitación incubando en un agitador a 4 °C durante 16 horas mientras se mezclaba suavemente. Se llevó a cabo posteriormente un análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo anti-GST- π .

Los resultados se muestran en las figuras 11 a 13. La figura 11 muestra que en el grupo tratado con ARNip de GST- π la fosforilación de cada proteína que constituye la cascada de señales de EGFR/PI3K/Akt/mTOR se redujo en comparación con el grupo tratado con ARNip revuelto, la figura 12 muestra que está implicado el proteasoma en la reducción de la expresión de p-EGFR por ARNip de GST- π , y la figura 13 muestra que GST- π se une a p-EGFR. Los resultados anteriores sugieren que GST- π se une a p-EGFR contribuyendo por tanto a la estabilización del mismo, se promueve la ubiquitinación de p-EGFR mediante la supresión de GST- π y la abundancia de p-EGFR disminuye.

55 Ejemplo 5: Efecto del inhibidor de GST- π sobre la proliferación celular, etc.

(1) Efecto del inhibidor de GST- π sobre la fosforilación de EGFR y Raf-1

60 Se llevó a cabo el cultivo de células M7609 según el procedimiento del ejemplo 1 (1). Se sembraron en placa las células sobre una placa de cultivo tisular de plástico de 60 mm para dar 4,0 x 10⁵ células/5 ml. Se añadió el inhibidor de GST- π C16C2 (preparado por Teijin Pharma Limited a petición) para dar 10, 50 y 100 μ M, y tras 24 horas se recogió un extracto celular. Se sometió el extracto celular así obtenido a análisis de proteínas cuantitativo usando un kit de ensayo de proteínas Micro BCA (no tratado: 8,5 μ g/ μ l, 10 μ l: 8,49 μ g/ μ l, 50 μ M: 7,68 μ g/ μ l, 100 μ M: 6,4 μ g/ μ l).

Se sometieron 50 µg del extracto celular a SDS-PAGE, y entonces se analizó la expresión de cada proteína mediante el método de inmunotransferencia de tipo Western.

(2) Efecto del inhibidor de GST-π sobre la proliferación celular, etc.

Se llevó a cabo el cultivo de células M7609 según el procedimiento del ejemplo 1 (1). Se sembraron en placa las células sobre una placa de cultivo tisular de plástico de 60 mm para dar $1,0 \times 10^5$ células/5 ml. Tras 16 horas, se añadió el inhibidor de GST-π para dar 50 µM. Se midió la cantidad total de células en la placa usando un hemocitómetro hasta el 2.º día. Como control para el inhibidor de GST-π, se llevó a cabo el tratamiento con DMSO al 0,05 %.

Los resultados se muestran en las figuras 14 y 15. Ha quedado claro a partir de estos resultados que el inhibidor de GST-π también podía suprimir la fosforilación de EGFR y Raf-1 (figura 14) y la proliferación celular (figura 15) del mismo modo que con GST-π desactivada.

Ejemplo 6: Efecto del inhibidor de la autofagia sobre células con GST-π desactivada

(1) Cultivo celular

Se llevó a cabo la transfección de ARNip de GST-π según el procedimiento del ejemplo 1 (2), entonces se reemplazó el medio por un medio libre de antibiótico, y se llevó a cabo la incubación durante 3 horas. Se sembraron en placa las células en una placa de cultivo tisular de plástico de 35 mm, se añadió el inhibidor de la autofagia 3-metiladenina (3-MA, SIGMA) para dar 1 o 5 mM, y tras esto se llevó a cabo el cultivo durante un tiempo predeterminado.

(2) Evaluación de células positivas para autofagia

Se sometieron las células cultivadas en (1) a tinción de inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-LC3 del mismo modo que para el ejemplo 3 (1).

(3) Tinción TUNEL

Se sometieron las células cultivadas en (1) a tinción TUNEL del mismo modo que para el ejemplo 3 (4).

Los resultados se muestran en las figuras 16 a 18. La figura 16 muestra la proporción de células positivas para autofagia por 1000 células en cada grupo, y puede observarse que la proporción de células positivas para autofagia disminuyó notablemente mediante el inhibidor de la autofagia. En la figura 17, la fila superior muestra el grupo tratado con ARNip de GST-π + 3-MA 1 mM y la fila inferior muestra el grupo tratado con ARNip de GST-π + 3-MA 5 mM. Puede observarse a partir de la figura 9 y la figura 17 que aumentaron notablemente las células positivas para apoptosis debido al uso de un inhibidor de la autofagia en combinación. La figura 18 es un gráfico que muestra que se indujo adicionalmente apoptosis mediante el inhibidor de la autofagia de una manera dependiente de la dosis. Se indujo apoptosis mediante la adición de ARNip de GST-π, pero cuando se añadió adicionalmente 3-MA, que es un inhibidor de la autofagia, se indujo adicionalmente apoptosis dependiente de la dosis adicional de 3-MA. Por tanto, ha quedado claro que puede inducirse apoptosis más eficazmente combinando un fármaco que suprime GST-π y un fármaco que suprime la autofagia.

Lista de secuencias

<110> Nitto Denko Corporation

<120> Agente inductor de apoptosis

<130> PCT2512ND

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ARNip de GSTpi

ES 2 708 932 T3

	<400> 1 gggaggcaag accuucuu t	21
5	<210> 2 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> ARNip revuelto	
	<400> 2 cgauucgcu gaccggcuuc auugcag	27

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para el uso en el tratamiento de cáncer debido a sobreexpresión de GST- π y mutación de KRAS, en la que la composición comprende como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia, en la que el fármaco que suprime la autofagia es un inhibidor de PI3K, y en la que el inhibidor de PI3K es un inhibidor de PI3K de clase III.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de PI3K es 3-metiladenina.
3. La composición según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de PI3K se selecciona del grupo que consiste en una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido de quimera de ADN/ARN y un vector que expresa el mismo.
- 15 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fármaco que suprime GST- π se selecciona del grupo que consiste en una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido de quimera de ADN/ARN y un vector que expresa el mismo.

FIG. 1

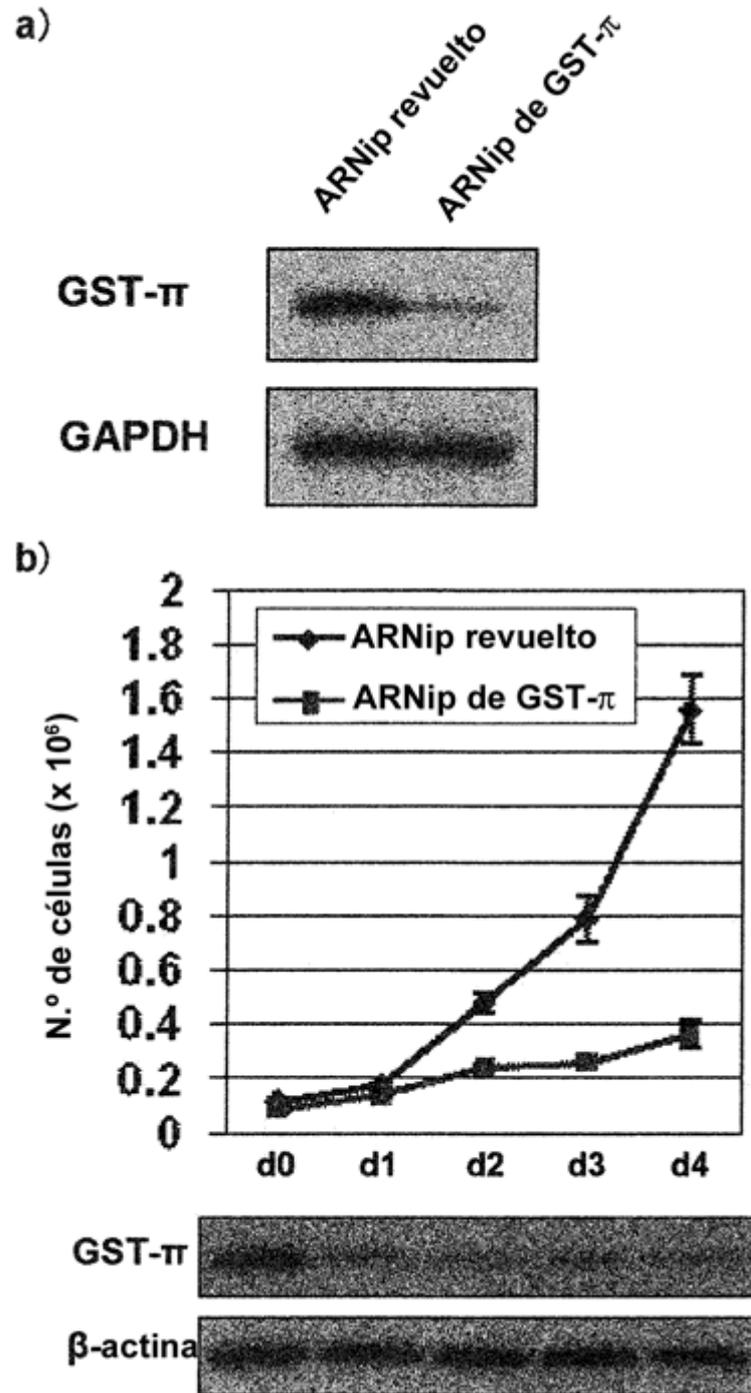


FIG. 2

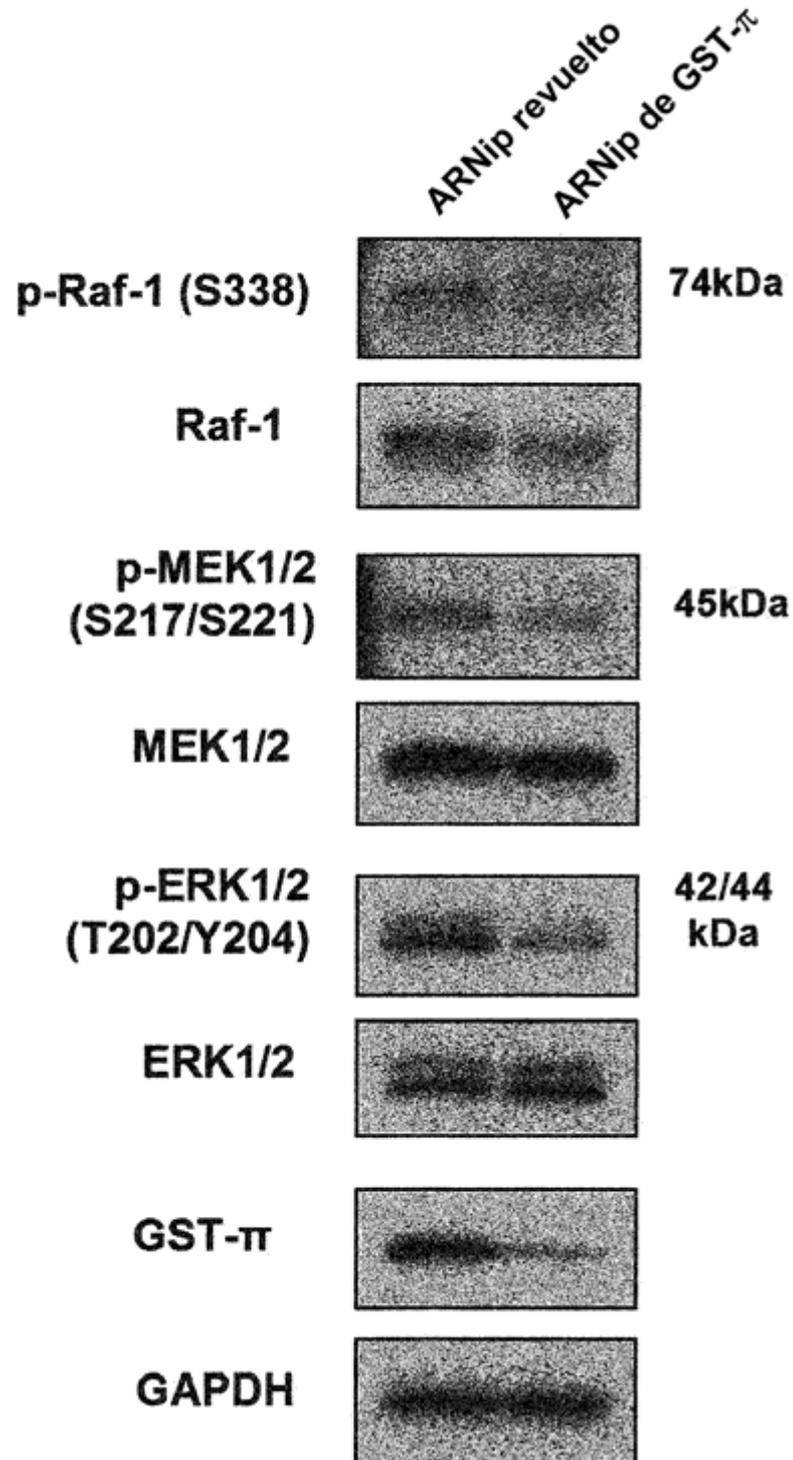


FIG. 3

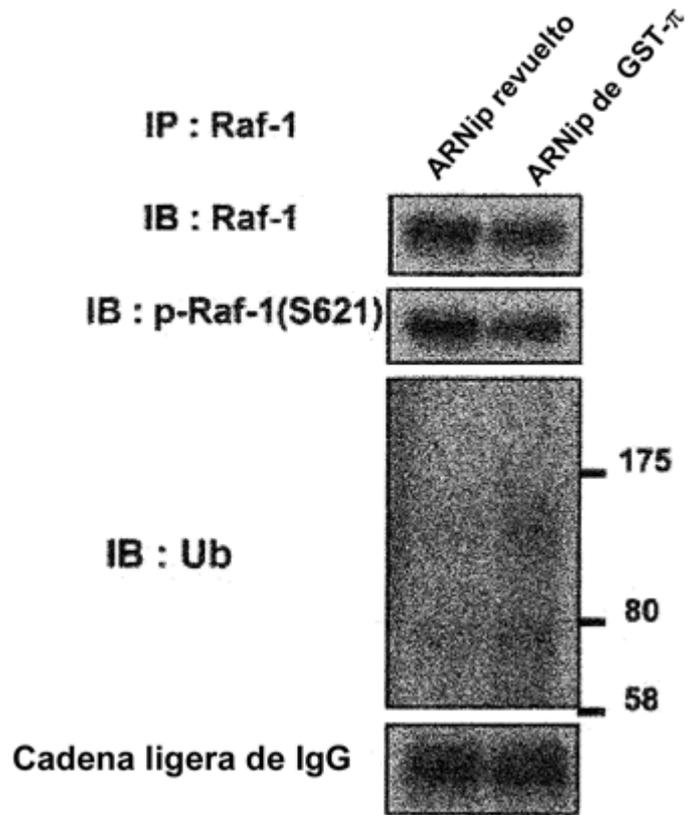


FIG. 4

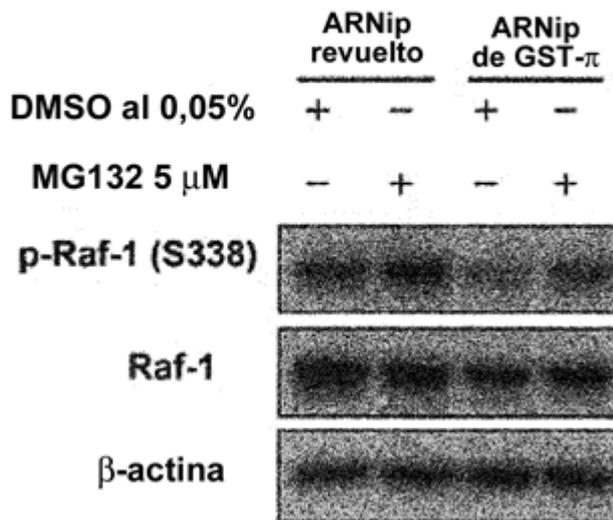


FIG. 5

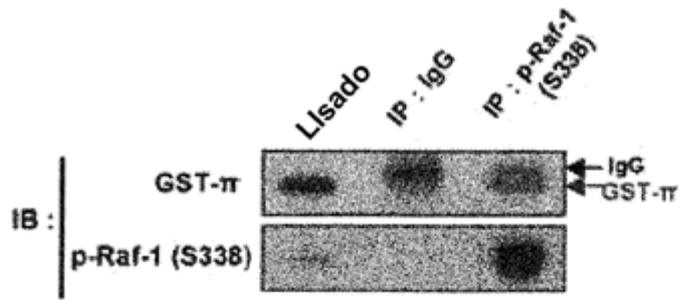


FIG. 6

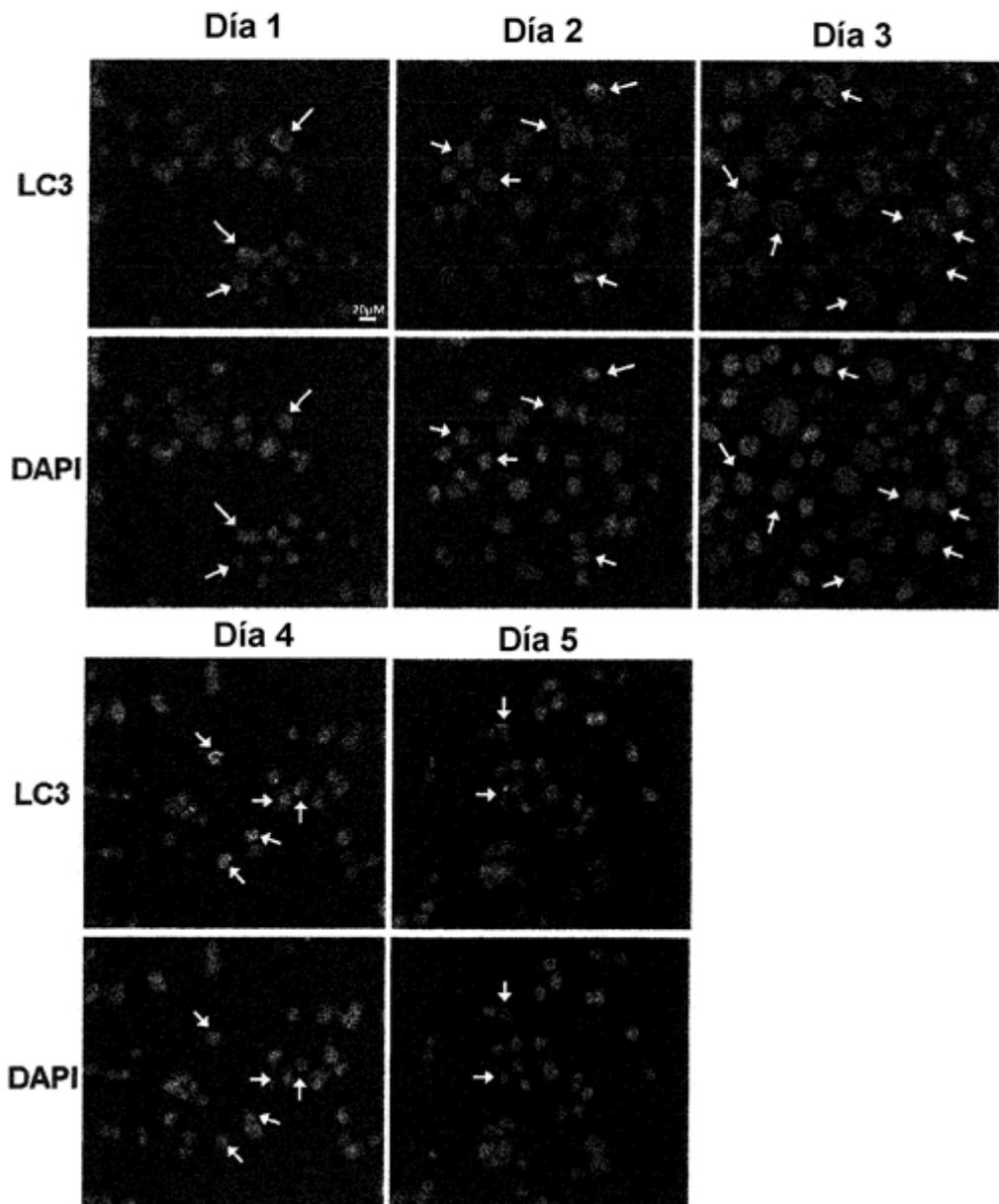


FIG. 7

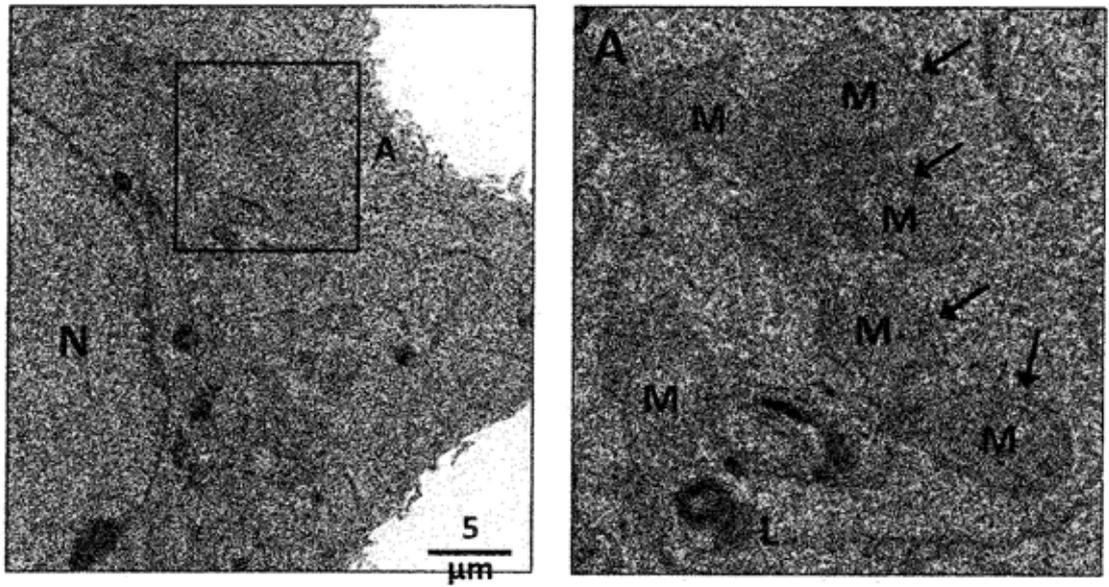


FIG. 8

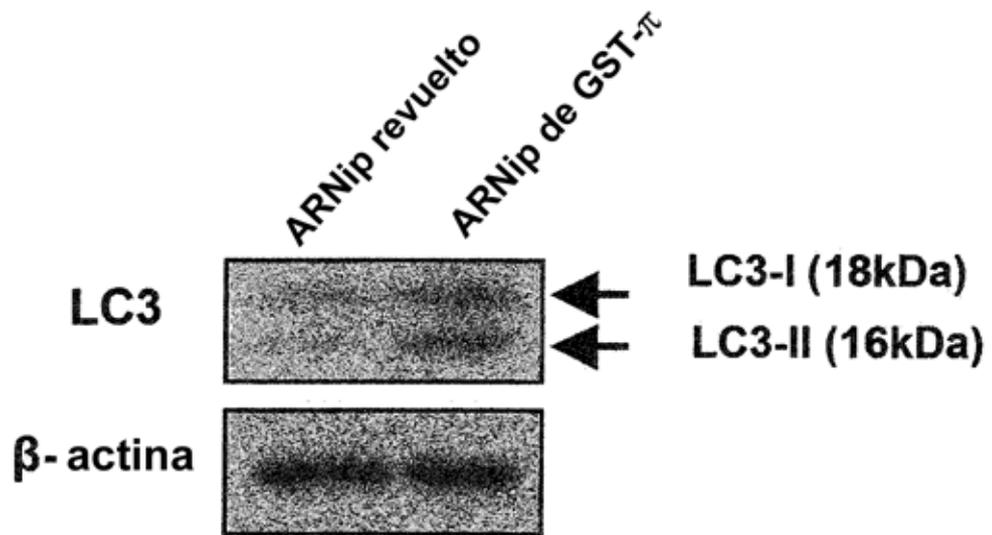


FIG. 9

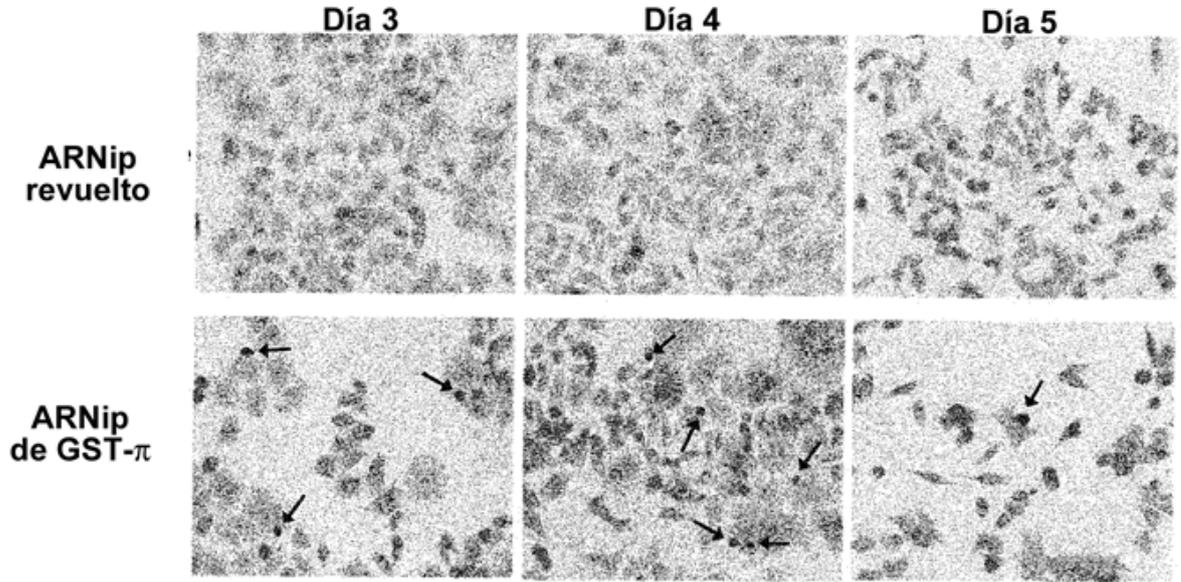


FIG. 10

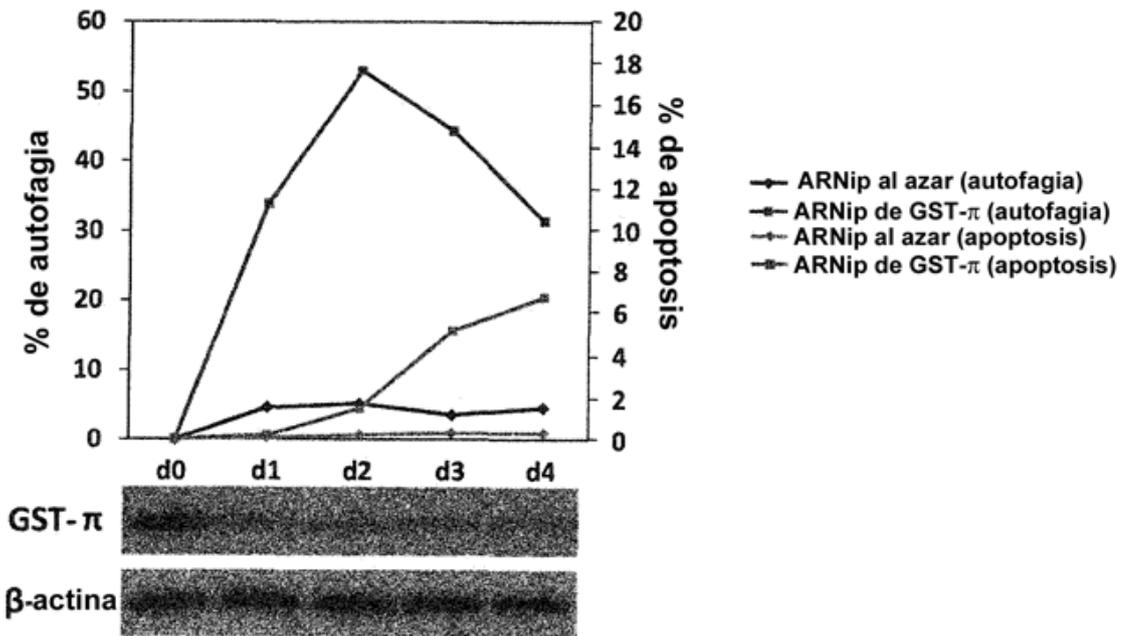


FIG. 11

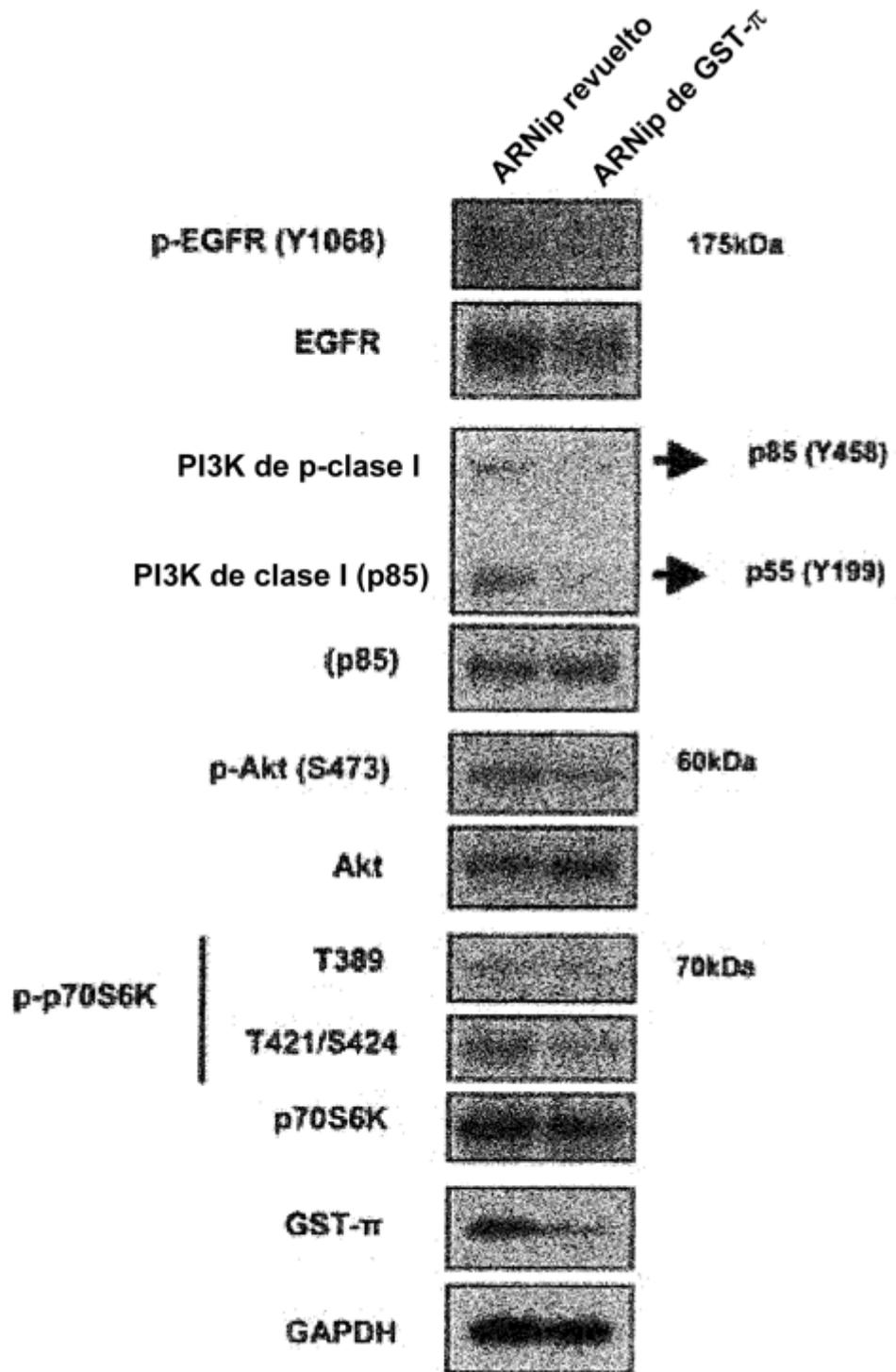


FIG. 12

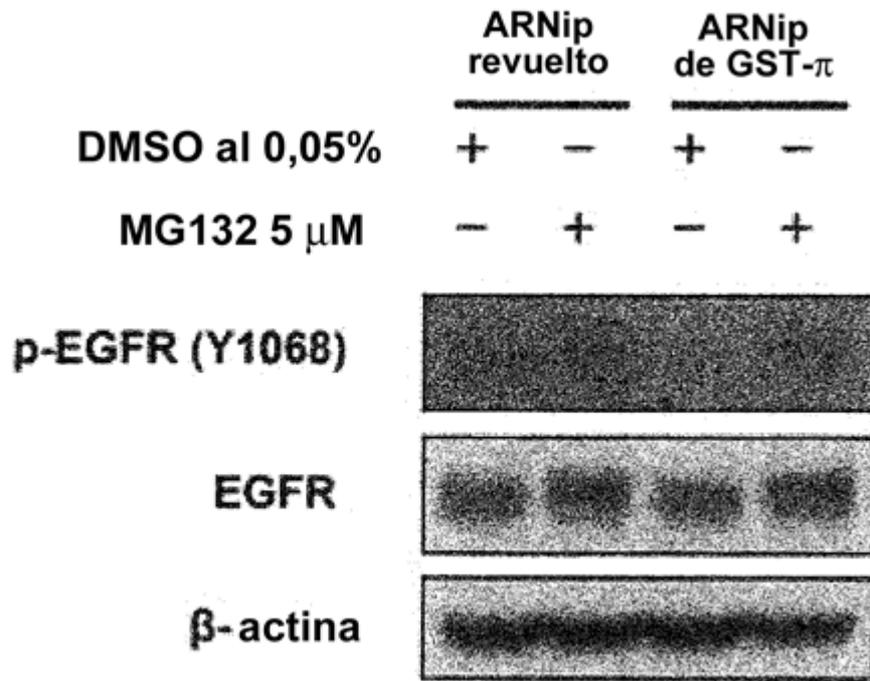


FIG. 13

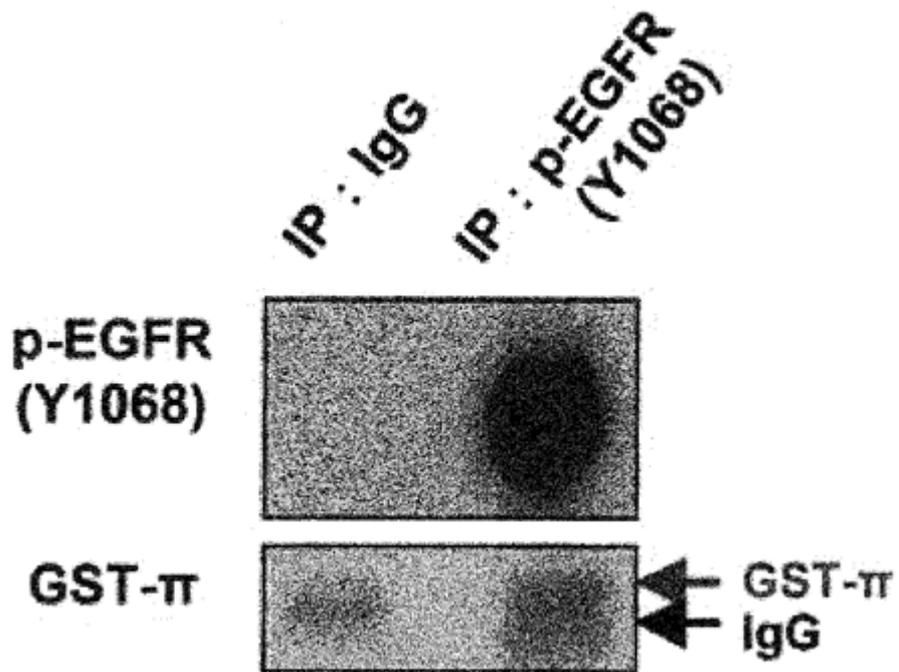


FIG. 14

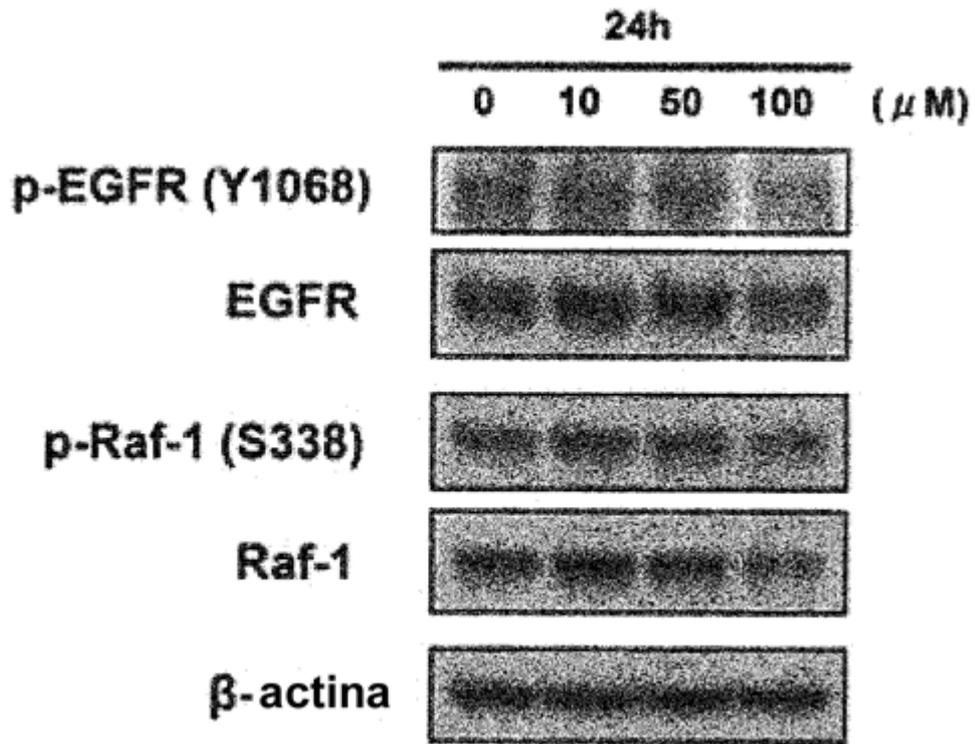


FIG. 15

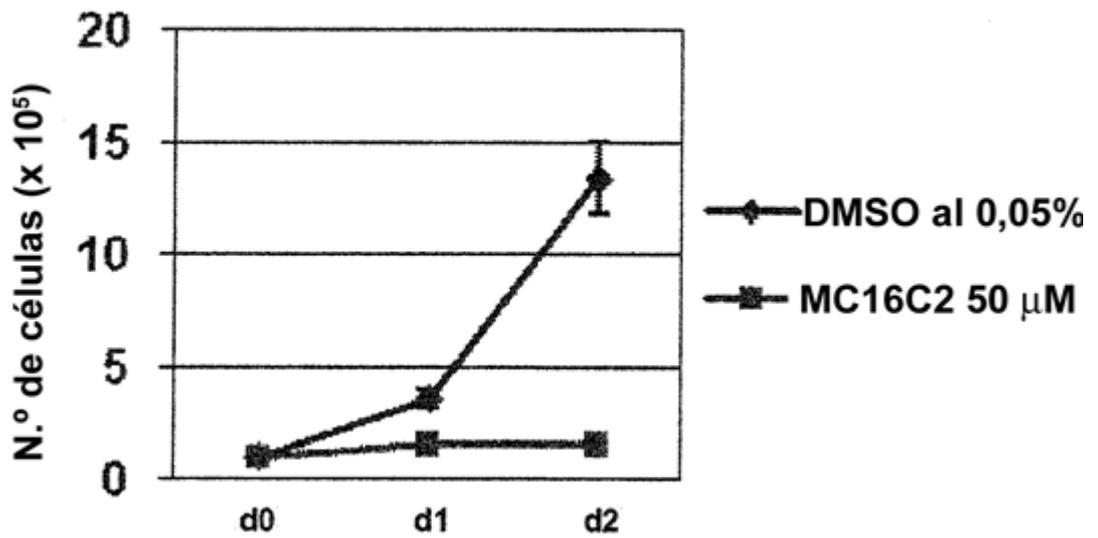


FIG. 16

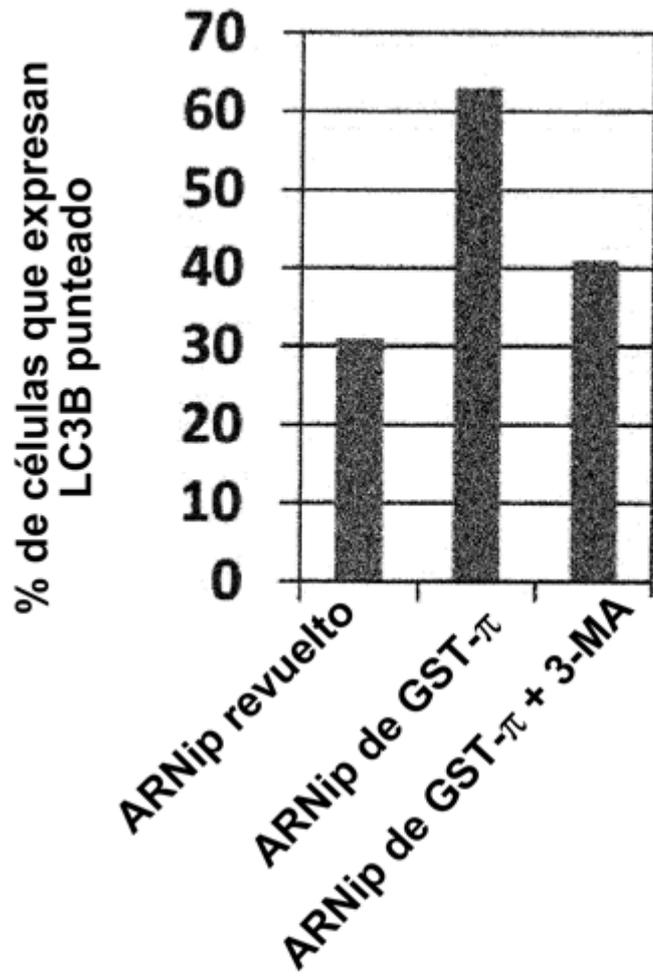


FIG. 17

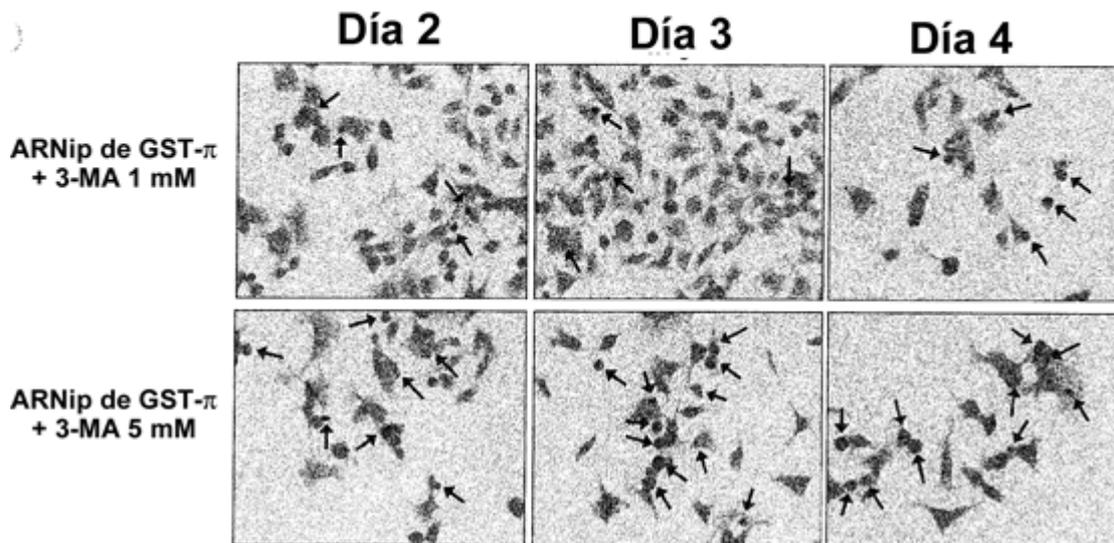


FIG. 18

