

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 211**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2015 PCT/JP2015/067240**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15194522**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2015 E 15810564 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.10.2021 EP 3159009**

54 Título: **Inhibidores de GST- π y RB1CC1 para su uso en el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

17.06.2014 JP 2014124782

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2022

73 Titular/es:

NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)
1-1-2 Shimohozumi
Ibaraki-shi, Osaka 567-8680, JP

72 Inventor/es:

NIITSU, YOSHIRO y
TANAKA, HIROYUKI

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 899 211 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

Inhibidores de GST- π y RB1CC1 para su uso en el tratamiento de cáncer

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad en la que hay una apoptosis anómala, comprendiendo la composición como principios activos un fármaco que suprime la glutatión S-transferasa (GST- π) y un fármaco que suprime la proteína en superhélice 1 inducible por RB1 (RB1CC1).

10

Antecedentes de la técnica

El cáncer es una de las enfermedades más importantes y problemáticas a las que se enfrenta la humanidad, y se está llevando a cabo un enorme esfuerzo de investigación para su tratamiento. El cáncer es una enfermedad en la que las células crecen de manera incontrolada debido a una mutación genética, una anomalía epigenética, etc. Con respecto a las anomalías genéticas en el cáncer, ya se ha informado de un gran número de ellas (por ejemplo, documento no de patente 1, etc.), y se cree que muchas de ellas están de alguna manera asociadas con la transducción de señales relacionadas con la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células. Además, debido a tales anomalías genéticas, se producen anomalías en la transducción de señales en las células que consiste en moléculas normales, y esto provoca la activación o inactivación de una cascada de señales específica y puede convertirse finalmente en un factor que desencadena la proliferación celular anómala. El tratamiento primario contra el cáncer se ha centrado en la supresión de la proliferación celular en sí, pero dado que dicho tratamiento también suprime la proliferación de las células con una proliferación fisiológicamente normal, iba acompañado de efectos secundarios tales como la caída del cabello, la disfunción gastrointestinal o la supresión de la médula ósea. Con el fin de reducir estos efectos secundarios, se está llevando a cabo el desarrollo de fármacos para el tratamiento de cáncer basados en un nuevo concepto tales como los fármacos molecularmente dirigidos que seleccionan como diana anomalías genéticas específicas del cáncer o a anomalías en la transducción de señales.

Como anomalía genética específica del cáncer, son bien conocidas las anomalías en KRAS (homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2). KRAS es una proteína de unión a GTP de bajo peso molecular (también denominada proteína G de bajo peso molecular) que se sitúa aguas abajo de un receptor de tirosina cinasa tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) o PDGFR (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), y participa en la transferencia de una señal relacionada con el crecimiento o la diferenciación desde estos receptores a una cascada de MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) aguas abajo. El KRAS normal se activa a través de Grb2 (proteína 2 unida a receptor del factor de crecimiento) y SOS (Son of Sevenless) mediante la activación de la tirosina cinasa de un receptor activado por la unión del ligando, y fosforila una MAPK tal como Raf (fibrosarcoma rápidamente acelerado) para impulsar la cascada MAPK, pero el KRAS de tipo mutante se activa constantemente sin la estimulación de un receptor y sigue transmitiendo una señal de crecimiento. Se cree que por ello se produce un crecimiento celular anómalo.

La expresión de la glutatión-S-transferasa (GST), que es una de las enzimas que catalizan la conjugación del glutatión, en particular la GST- π (glutatión S-transferasa pi, también denominada GSTP1), aumenta en diversas células cancerosas, y se ha señalado que existe la posibilidad de que sea un factor de resistencia a algunos antineoplásicos. De hecho, se sabe que cuando se hace que el ADN antisentido de la GST- π o un inhibidor de la GST- π actúe sobre una línea celular cancerosa que sobreexpresa la GST- π y que presenta resistencia a los fármacos, la resistencia a los fármacos se suprime (documentos no de patente 2 a 4). Además, en un informe reciente, cuando se hace que el ARNip de GST- π actúe sobre una línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos que sobreexpresa GST- π , se suprime su proliferación y aumenta la apoptosis (documento no de patente 5). Además, se ha informado de que, cuando el ARNip de GST- π se hace actuar sobre una línea de cáncer que tiene una mutación de KRAS, se suprime la activación de Akt y aumenta la autofagia, pero sólo hay un grado medio de inducción de la apoptosis (documento no de patente 6), y el documento de patente 1 describe un agente inductor de la apoptosis, etc. que incluye un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime la autofagia como principios activos.

Sin embargo, hasta ahora apenas se ha aclarado la relación entre la GST- π y la proliferación celular o la apoptosis, el mecanismo molecular de la GST- π , y el papel, etc., de la 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 ser influida por una pluralidad de moléculas, cuando se inhibe el efecto de una determinada molécula, puede activarse otra cascada de señales, y a menudo no puede obtenerse el efecto esperado. Por tanto, es necesario dilucidar el complicado mecanismo de transducción de señales celulares con el fin de desarrollar fármacos superiores dirigidos molecularmente, pero sólo se ha dilucidado una parte muy pequeña del mecanismo en muchos años de investigación, y se necesita un mayor esfuerzo de investigación.

65

Lista de referencias

Bibliografía de patentes

[PL1] Solicitud de patente internacional WO2012/176282

5 EP 2724729A1 se refiere a un agente inductor de la apoptosis.

Bibliografía no de patentes

[NPL1] Futreal *et al.*, Nat Rev Cancer. 2004; 4 (3): 177-83

10

[NPL2] Takahashi y Niitsu, Gan To Kagaku Ryoho. 1994; 21 (7): 945-51

[NPL3] Ban *et al.*, Cancer Res. 1996; 56 (15): 3577-82

15 [NPL4] Nakajima *et al.*, J Pharmacol Exp Ther. 2003; 306 (3): 861-9

[NPL5] Hokaiwado *et al.*, Carcinogenesis. 2008; 29 (6): 1134-8

20

[NPL6] Nishita *et al.*, Encuentro anual 102º de la AACR, n.º de resumen 1065

Sumario de la invención

Problemas que van a resolverse mediante la invención

25 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para inducir la apoptosis y/o la inhibición de la proliferación de manera eficaz en las células y un método que usa la misma.

Medios para resolver los problemas

30 Al llevar a cabo una intensa investigación para dilucidar el mecanismo molecular de la GST- π , los presentes inventores han descubierto que cuando hay una inhibición simultánea de la expresión de la GST- π y de la expresión de la RB1CC1 (proteína en superhélice 1 inducible por RB1) en las células, en comparación con un caso en el que se inhibe la expresión de sólo una de las dos, la proliferación celular se suprime más fuertemente, y han encontrado además que la autofagia, que es inducida por la inhibición de la expresión de GST- π , se suprime notablemente al inhibir
35 simultáneamente la expresión de RB1CC1, y la apoptosis se induce fuertemente y, por tanto, se ha logrado la presente invención.

Es decir, la presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

40 **Efectos de la invención**

Dado que el agente inductor de la apoptosis usado por la presente invención puede inducir la apoptosis y suprimir la proliferación celular de forma más eficaz en comparación con uno convencional, es extremadamente útil como composición farmacéutica. En el tratamiento de cáncer en particular, dado que las células cancerosas pueden
45 destruirse mediante apoptosis, no sólo es posible inhibir la progresión del cáncer, sino que también puede esperarse un efecto para hacer remitir el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

50 [FIG. 1] La figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de la supresión de la proliferación celular mediante la inactivación de GST- π y/o RB1CC1 en diversas células cancerosas.

[FIG. 2] La figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de la supresión de la proliferación celular mediante la inactivación de GST- π y/o RB1CC1 en células MDA-MB-231.

55

[FIG. 3] La figura 3 es un gráfico que muestra el efecto de la supresión de la proliferación celular mediante la inactivación de GST- π o GST- π + RB1CC1 en células M7609.

60 [FIG. 4] La figura 4 es un diagrama que muestra que la autofagia es inducida por la inactivación de GST- π en células MIA PaCa-2.

[FIG. 5] La figura 5 es un diagrama fotográfico que muestra el resultado de la inmunotinción de células MIA PaCa-2, tratadas con ARNip de control, con un anticuerpo anti-LC3B.

65 [FIG. 6] La figura 6 es un gráfico que muestra el resultado de la inmunotinción de células MIA PaCa-2, tratadas con

ARNip de GST- π , con un anticuerpo anti-LC3B.

[FIG. 7] La figura 7 es un gráfico que muestra el resultado de la inmunotinción de células MIA PaCa-2, tratadas con ARNip de GST- π y ARNip de RB1CC1, con un anticuerpo anti-LC3B.

[FIG. 8] La figura 8 es un diagrama que muestra el resultado de la detección de la caspasa-3 escindida en las células MIA PaCa-2 tratadas con diversos tipos de ARNip.

Modos para llevar a cabo la invención

La presente invención usa un agente o una composición para suprimir la proliferación celular (a continuación en el presente documento, también denominado “agente supresor de la proliferación celular” o “composición supresora de la proliferación celular”) y un agente o una composición para inducir la apoptosis (a continuación en el presente documento, también denominado “agente inductor de la apoptosis” o “composición inductora de la apoptosis”) que contiene como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime RB1CC1. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

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

La RB1CC1 es una proteína codificada por el gen RB1CC1 y se sabe que induce la expresión de RB1 (retinoblastoma 1), que es un gen supresor de cáncer (Chano *et al.*, *Oncogene*. 2002; 21 (8): 1295-8). El RB1CC1 está presente en diversos animales, incluyendo humanos, y se conoce la información de su secuencia (por ejemplo, humano: BAB69690 (AB059622), rata: NP_001101371 (NM_001107901), ratón: NP_033956 (NM_009826), etc. Los números denotan los números de registro en la base de datos del NCBI; los que están fuera del paréntesis son números de secuencia de aminoácidos, y los que están dentro del paréntesis son números de secuencia de bases).

Dado que existe la posibilidad de que se produzca una mutación de una secuencia genética o de una secuencia de aminoácidos entre individuos biológicos que no perjudique la función fisiológica de una proteína, el gen GST- π y GSTP1, y el gen RB1CC1 y RB1CC1 de la presente invención no se limitan a proteínas o ácidos nucleicos que tengan la misma secuencia que las secuencias conocidas, y pueden incluir aquellos que tienen una secuencia que es diferente de la secuencia anterior por uno o más aminoácidos o bases, típicamente 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 los GST- π y RB1CC1 conocidos. Las funciones específicas de GST- π y RB1CC1 son las que se describen más adelante.

En la presente memoria descriptiva, expresiones 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 lo contrario, que la descripción que les sigue se aplica a todas las invenciones descritas en la presente memoria descriptiva. Además, a menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que normalmente entiende un experto en la técnica. La totalidad de todas las patentes, publicaciones de patentes y otras publicaciones a las que se hace referencia en este documento se incorporan en el presente documento como referencia.

Los ejemplos del “fármaco que suprime GST- π ” usados 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, un ácido nucleico inhibidor tal como una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido o un polinucleótido quimera de ADN/ARN para el ADN que codifica para GST- π o un vector que lo expresa.

Los ejemplos del fármaco que suprime la actividad de la 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 el documento WO 95/08563, WO 96/40205, WO 99/54346, documento no de patente 4, etc.), ketoprofeno (documento no de patente 2), 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 están o bien disponibles comercialmente o bien pueden producirse de manera adecuada basándose en técnicas conocidas.

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

La supresión de GST- π puede determinarse mediante la expresión o actividad de GST- π en las 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 que utilice un anticuerpo anti-GST- π , EIA (inmunoensayo enzimático) (por ejemplo, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), etc.), RIA (radioinmunoensayo) (por ejemplo, IRMA (ensayo inmunoradiométrico), RAST (ensayo de radioalergoabsorbencia), RIST (ensayo de radioinmunoabsorción), etc.), un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método inmunohistoquímico, un método inmunocitoquímico, un método de citometría de flujo, diversos métodos de hibridación que utilizan un ácido nucleico que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica para GST- π o un fragmento único del mismo, 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 ello, la unión a una proteína tal como, por ejemplo, Raf-1 (en particular Raf-1 fosforilada) o EGFR (en particular EGFR fosforilada) 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).

Los ejemplos del "fármaco que suprime RB1CC1" usados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, un fármaco que suprime la producción y/o actividad de RB1CC1 y un fármaco que promueve la degradación y/o inactivación de RB1CC1. Los ejemplos del fármaco que suprime la producción de RB1CC1 incluyen, pero no se limitan a, un ácido nucleico inhibidor tal como una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido o un polinucleótido quimera de ADN/ARN para el ADN que codifica para RB1CC1 o un vector que lo expresa.

Los ejemplos del fármaco que suprime la actividad de RB1CC1 incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-RB1CC1 y un mutante negativo dominante de RB1CC1. Estos fármacos están o bien disponibles comercialmente o bien pueden producirse de manera adecuada basándose en técnicas conocidas.

El fármaco que suprime la producción o la actividad de RB1CC1 es preferiblemente un ácido nucleico inhibidor, tal como una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido o un polinucleótido quimera de ADN/ARN para el ADN que codifica para RB1CC1 o un vector que lo expresa, en cuanto a alta especificidad y baja posibilidad de efectos secundarios.

Según la invención, el fármaco supresor de RB1CC1 se selecciona del grupo que consiste en una molécula de iARN, una ribozima, un ácido antisentido, un polinucleótido quimera de ADN/ARN para el ADN que codifica para RB1CC1, un vector que lo expresa, un anticuerpo anti-RB1CC1 y un mutante negativo dominante de RB1CC1.

La supresión de RB1CC1 puede determinarse mediante la expresión o actividad de RB1CC1 en las células que se suprimen en comparación con un caso en el que no se utiliza un agente supresor de RB1CC1. La expresión de RB1CC1 puede evaluarse mediante cualquier técnica conocida; los ejemplos de la misma incluyen, pero no se limitan a, un método de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-RB1CC1, EIA (por ejemplo, ELISA, etc.), RIA (por ejemplo, IRMA, RAST, RIST, etc.), un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método inmunohistoquímico, un método inmunocitoquímico, un método de citometría de flujo, diversos métodos de hibridación que utilizan un ácido nucleico que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica para RB1CC1 o un fragmento único del mismo, 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 RB1CC1 puede evaluarse analizando una actividad conocida de RB1CC1, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, una actividad de inducción de RB1, mediante cualquier técnica conocida; los ejemplos de la misma incluyen un método de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-RB1CC1, EIA (por ejemplo, ELISA, etc.), RIA (por ejemplo, IRMA, RAST, RIST, etc.), un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método inmunohistoquímico, un método inmunocitoquímico, un método de citometría de flujo, diversos métodos de hibridación que utilizan un ácido nucleico que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica para RB1 o un fragmento único del mismo, 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.

Cuando se usa en el presente documento, la molécula de iARN denota cualquier molécula que provoque interferencia de ARN, incluyendo, pero sin limitarse a, una molécula de ácido nucleico tal como ARNip (ARN de interferencia pequeño), ARNm (ARNmicro), ARNhc (ARN de horquilla corta), ARNda (ARN dirigido a ADN), ARNpi (ARN de interacción con Piwi) o ARNipar (ARNip asociado a repeticiones) y formas modificadas de los mismos. La molécula de ácido nucleico anterior (por ejemplo, ARNip, etc.) puede incluir ARN, ADN, APN modificado o no modificado o un complejo de los mismos. Estas moléculas de iARN pueden estar disponibles comercialmente o pueden ser diseñadas y preparadas basándose en información de secuencias conocidas, etc.

Además, cuando se usa en el presente documento, el ácido nucleico antisentido incluye ARN, ADN, APN modificado o no modificado o un complejo de los mismos.

5 Cuando se usa en el presente documento, el polinucleótido quimera de ADN/ARN incluye, pero no se limita a, un polinucleótido bicatenario que se compone de ADN y ARN que inhibe la expresión de un gen diana descrito en, por ejemplo, el documento JP, A, 2003-219893, y un oligonucleótido quimera de ADN/ARN descrito en Park *et al.*, *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; (42): 225-6.

10 El fármaco que suprime GST- π y el fármaco que suprime RB1CC1 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 con un intervalo de tiempo entre ellas. Cuando se administran con un intervalo de tiempo entre ellas, la formulación que contiene un fármaco que suprime GST- π puede administrarse antes de la formulación que contiene un fármaco que suprime RB1CC1 o puede administrarse después.

15 También se divulga en el presente documento un agente o una composición para potenciar la inducción de la apoptosis y/o la supresión de la proliferación celular (a continuación en el presente documento, también denominado "agente potenciador de la inducción de la apoptosis", "agente potenciador de la supresión de la proliferación celular", "composición potenciadora de la inducción de la apoptosis" o "composición potenciadora de la supresión de la proliferación celular") mediante un fármaco que suprime GST- π , conteniendo el agente o la composición como principio activo un fármaco que suprime RB1CC1. "Potenciar" la inducción de la apoptosis y/o la supresión de la proliferación celular mediante un fármaco que suprime GST- π significa aumentar el grado de inducción de la apoptosis y/o la supresión de la proliferación celular cuando dicho agente potenciador se hace actuar sobre una célula además de un fármaco que suprime GST- π en comparación con el grado de inducción de la apoptosis y/o la supresión de la proliferación celular cuando se utiliza un fármaco que suprime GST- π .

El grado de aumento no está limitado y puede ser, por ejemplo, un grado tal que, en comparación con un momento en el que sólo se usa un fármaco que suprime GST- π , la dosis de un fármaco que suprime GST- π que puede dar el mismo efecto que cuando se usan el fármaco en cuestión y el agente potenciador se disminuye en aproximadamente 1,25 veces o más, aproximadamente 1,5 veces o más, aproximadamente 1,75 veces o más, aproximadamente 2 veces o más, aproximadamente 2.5 veces o más, aproximadamente 3 veces o más, aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 6 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 10 veces o más, aproximadamente 20 veces o más, aproximadamente 25 veces o más, aproximadamente 50 veces o más, o aproximadamente 100 veces o más (en este caso, por ejemplo, que la dosis se disminuya en aproximadamente 2 veces o más significa que la dosis se hace aproximadamente $\frac{1}{2}$ veces o menos); en el caso de la inducción de la apoptosis, es un grado tal que cuando el porcentaje de inducción de la apoptosis cuando sólo se utiliza un fármaco que suprime GST- π se define como x (%), el porcentaje de inducción de la apoptosis cuando se utilizan el fármaco que suprime GST- π y el agente potenciador (por ejemplo, la proporción de células para las que se detecta la inducción de la apoptosis en relación con el total de células sometidas a prueba) se aumenta a partir de x en aproximadamente el 5% o más de (100 - x), aproximadamente el 10% o más, aproximadamente el 15% o más, aproximadamente el 20% o más, aproximadamente el 25% o más, aproximadamente el 30% o más, aproximadamente el 40% o más, aproximadamente el 50% o más, aproximadamente el 60% o más, aproximadamente el 70% o más, aproximadamente el 80% o más, aproximadamente el 90% o más, aproximadamente el 95% o más, aproximadamente el 99% o más, o el 100%, y en el caso de la supresión de la proliferación celular se trata de un grado tal que, en comparación con el número de células cuando sólo se utiliza un fármaco que suprime GST- π , el número de células después del cultivo durante un tiempo predeterminado cuando se utilizan el fármaco que suprime GST- π y el agente potenciador se disminuye en aproximadamente el 5% o más, aproximadamente el 10% o más, aproximadamente el 15% o más, aproximadamente el 20% o más, aproximadamente el 25% o más, aproximadamente el 30% o más, aproximadamente el 40% o más, aproximadamente el 50% o más, aproximadamente el 60% o más, aproximadamente el 70% o más, aproximadamente el 80% o más, aproximadamente el 90% o más, aproximadamente el 95% o más, o el 100% (en este caso, por ejemplo, disminuir el número de células en aproximadamente el 5% o más significa que cuando el número de células después del cultivo durante un tiempo predeterminado cuando sólo se utiliza el fármaco que suprime GST- π es y, el número de células es y - (y \times 0,05) células o menos).

55 La cantidad de principio activo formulado en el agente o la composición usado por la presente invención puede ser una cantidad que induzca la apoptosis y/o suprima la proliferación celular cuando se administra el agente o la composición. Además, es preferible una cantidad que no provoque un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo se conoce o puede determinarse adecuadamente 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. La inducción de la apoptosis puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas, por ejemplo, mediante la detección de un fenómeno específico de la apoptosis, tal como la fragmentación del ADN, la unión de la anexina V a la membrana celular, el cambio del potencial de la membrana mitocondrial o la activación de la caspasa, o mediante la tinción TUNEL. Además, la supresión de la proliferación celular puede evaluarse mediante diversos métodos conocidos, por ejemplo, el recuento del número de células vivas a lo largo del tiempo, la medición del tamaño, el volumen o el peso de un tumor, la medición de la cantidad

de ADN sintetizado, el método WST-1, el método BrdU (bromodesoxiuridina) o el método de incorporación de timidina ³H. La cantidad de principio activo formulado puede variar según la forma en que se administre el 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 determinarse 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 llevarse a cabo adecuadamente por un experto en la técnica.

La presente invención también se refiere a un procedimiento tal como se define en las reivindicaciones 3-4 adjuntas. También se divulga en el presente documento un procedimiento para producir un agente o una composición para inducir la apoptosis o suprimir la proliferación celular, comprendiendo el procedimiento la formulación como principios activos de un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime RB1CC1; el uso de un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime RB1CC1 en la producción de un agente o una composición para inducir la apoptosis o suprimir la proliferación celular; una combinación de un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime RB1CC1 para su uso en la inducción de la apoptosis o la supresión de la proliferación celular; y un método para inducir la apoptosis o suprimir la proliferación celular, comprendiendo el método la administración de cantidades eficaces de un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime RB1CC1.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para producir un agente o una composición para inducir la apoptosis en una célula en la que se suprime GST- π , comprendiendo el procedimiento la formulación de un fármaco que suprime RB1CC1 como principio activo; el uso de un fármaco que suprime RB1CC1 en la producción de un agente o una composición para inducir la apoptosis en una célula en la que se suprime GST- π ; un fármaco que suprime RB1CC1 usado en la inducción de la apoptosis en una célula en la que GST- π está suprimida; y un método para inducir la apoptosis en una célula en la que GST- π está suprimida, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de un fármaco que suprime RB1CC1.

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

Todos los métodos anteriores para inducir la apoptosis o suprimir la proliferación celular pueden ser o bien un método *in vitro* o bien un método *in vivo*. En el caso de un método *in vivo*, el fármaco puede administrarse a un sujeto que lo requiera. Además, los fármacos de los métodos son tal como se describieron anteriormente, y la cantidad eficaz de fármaco puede ser una cantidad que induzca la apoptosis o suprima la proliferación celular en las células a las que se administra. También es preferible una cantidad que no provoque un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo es conocida o puede determinarse adecuadamente mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas, etc., y un método de prueba de este tipo lo conoce bien un experto en la técnica. La inducción de la apoptosis o la supresión de la proliferación celular pueden evaluarse mediante diversas técnicas conocidas, incluyendo las descritas anteriormente. La cantidad eficaz mencionada anteriormente no tiene que ser necesariamente la que produce la apoptosis o la supresión de la proliferación celular en todas las células de una población celular a la que se administra el fármaco. Por ejemplo, la cantidad eficaz anterior puede ser una cantidad que efectúe la apoptosis o la supresión de la proliferación celular en, de la población celular, 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.

Los agentes inductores de la apoptosis y supresores de la proliferación celular usados por la presente invención pueden inducir la apoptosis o la supresión de la proliferación de manera eficaz incluso en células que tienen una anomalía en la proliferación celular, etc., y son eficaces como componente de una composición farmacéutica. Por tanto, un aspecto de la presente divulgación incluye una composición que contiene el agente inductor de la apoptosis o el agente supresor de la proliferación celular de la presente divulgación.

La composición farmacéutica usada por la presente invención es eficaz en el tratamiento de una enfermedad en la que hay apoptosis anómala en particular. Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad en la que hay apoptosis anómala, conteniendo la composición farmacéutica el agente inductor de la 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 la proliferación celular anómala, una enfermedad debida a la mutación de KRAS y una enfermedad debida a la sobreexpresión de GST- π .

Los ejemplos de la enfermedad debida a la proliferación celular anómala incluyen, pero no se limitan a, un tumor benigno o maligno, hiperplasia, queloide, síndrome de Cushing, aldosteronismo primario, eritroplasia, policitemia vera, leucoplasia, cicatriz hiperplásica, liquen plano y lentiginosis.

Los ejemplos de la enfermedad debida a la mutación de KRAS incluyen, pero no se limitan a, un tumor benigno o maligno (también denominado cáncer o neoplasia maligna). Los ejemplos de la mutación de KRAS incluyen, pero no se limitan a, una mutación que provoca la activación constitutiva de KRAS, por ejemplo, una mutación que inhibe la

GTPasa endógena, una mutación que aumenta la tasa de intercambio de nucleótido de guanina, etc. Los ejemplos específicos de una mutación de este tipo incluyen, pero no se limitan a, una mutación en el aminoácido 12, 13 y/o 61 de KRAS humano (inhibe la GTPasa endógena) y una mutación en el aminoácido 116 y/o 119 de KRAS humano (aumenta la tasa de intercambio de nucleótido de guanina) (Bos, *Cancer Res.* 1989; 49 (17): 4682-9, Levi *et al.*, *Cancer Res.* 1991; 51 (13): 3497-502).

Los ejemplos de las enfermedades debidas a la sobreexpresión de GST- π incluyen, pero no se limitan a, un tumor benigno o maligno, en particular un tumor maligno resistente a los fármacos (por ejemplo, resistente a un agente alquilante tal como melfalán o ciclofosfamida, un antibiótico antitumoral basado en antraciclinas tal como adriamicina, un complejo de platino tal como cisplatino, etopósido, etc.).

En la presente invención, la enfermedad en la que hay apoptosis anómala es un cáncer. Los ejemplos del cáncer en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sarcomas tales como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, 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 de páncreas, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma de vías biliares, carcinoma anal, carcinoma renal, carcinoma ureteral, carcinoma de vejiga, carcinoma de próstata, carcinoma de pene, carcinoma de testículo, carcinoma de útero, carcinoma de ovario, carcinoma de vulva, carcinoma de vagina y carcinoma de piel y, además, leucemia y linfoma maligno. En la presente invención, el "cáncer" incluye tumor maligno epitelial y tumor maligno no epitelial. El cáncer en la presente invención puede estar presente en cualquier sitio del cuerpo, por ejemplo, el cerebro, la cabeza y el cuello, el pecho, 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, las vías urinarias, 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, la tiroides, la glándula suprarrenal, el peritoneo, el mesenterio, la médula ósea, la sangre, el sistema vascular, el sistema linfático tal como un ganglio linfático, líquido linfático, etc.

En una realización de la presente invención, el cáncer incluye células cancerosas que tienen el KRAS mutado definido anteriormente. En una realización de la presente invención, el cáncer incluye células cancerosas que muestran una proliferación independiente de las hormonas o del factor de crecimiento. En una realización de la presente invención, el cáncer incluye células cancerosas que presentan sobreexpresión de GST- π . En una realización de la presente invención, el cáncer es resistente a los fármacos. En una realización de la presente invención, el cáncer tiene resistencia a un medicamento seleccionado del grupo que consiste en un agente alquilante tal como melfalán o ciclofosfamida, un antibiótico antitumoral basado en antraciclinas tal como adriamicina, un complejo de platino tal como cisplatino y etopósido. En una realización de la presente invención, el cáncer tiene resistencia a un medicamento seleccionado del grupo que consiste en melfalán, ciclofosfamida, adriamicina, cisplatino y etopósido.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de 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 RB1CC1, tal como se define en la reivindicación 1; y a un procedimiento para producir una composición 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 RB1CC1. El fármaco, la cantidad de formulación y la enfermedad en la que hay apoptosis anómala en el procedimiento de producción o uso anterior son tal como se describió anteriormente. La formulación de cada fármaco puede llevarse a cabo según cualquier técnica conocida.

El agente inductor de la apoptosis, el inhibidor de la proliferación celular y la composición que los contiene pueden usarse en combinación con otro principio activo. En este caso, el uso en combinación incluye, por ejemplo, la administración de otro principio activo como formulación independiente, y la administración de otro principio activo como mezcla con al menos un tipo de otro medicamento. Cuando se administra como formulación independiente, puede administrarse una formulación que contiene otro principio activo antes, al mismo tiempo o después de otra formulación.

Los ejemplos de un principio activo de este tipo incluyen uno que sea eficaz para tratar una enfermedad como diana. Por ejemplo, cuando una enfermedad que va a tratarse es un cáncer, puede usarse un antineoplásico en combinación. Los ejemplos del antineoplásico incluyen un agente alquilante tal como ifosfamida, clorhidrato de nimustina, ciclofosfamida, dacarbazina, melfalán o ranimustina, un antagonista del metabolismo tal como clorhidrato de gemcitabina, enocitabina, ocfosfato de citarabina, una formulación de citarabina, un fármaco combinado de tegafur/uracilo o tegafur/gimeracilo/oteracilo de potasio (por ejemplo, TS-1), doxifluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato o mercaptopurina, un antibiótico antitumoral tal como clorhidrato de idarubicina, clorhidrato de epirubicina, clorhidrato de daunorubicina, citrato de daunorubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de pirarubicina, clorhidrato de bleomicina, sulfato de peplomycin, clorhidrato de mitoxantrona o mitomicina C, un alcaloide tal como etopósido, clorhidrato de irinotecán, tartarato de vinorelbina, hidrato de docetaxel, paclitaxel, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina o sulfato de vinblastina, un fármaco terapéutico hormonal tal como anastrozol, citrato

de tamoxifeno, citrato de toremifeno, bicalutamida, flutamida o fosforato de estramustina, un complejo de platino tal como carboplatino, cisplatino (CDDP) o nedaplatino, un inhibidor de la angiogénesis tal como talidomida, neovastat o bevacizumab y L-asparaginasa.

5 Otros ejemplos de dicho otro principio activo incluyen un fármaco que suprime la autofagia. 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 lo contrario.

10 La autofagia, que significa “autodevoración”, 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. La autofagia se observa en una gran variedad de especies biológicas, incluyendo levaduras y mamíferos, y va acompañada generalmente de una serie de procesos que incluyen (a) la formación de un PAS (sitio de ensamblaje del fagoforo), (b) elongación y extensión del fagoforo (membrana de aislamiento) que rodea a una proteína que va a degradarse y formación de un autofagosoma que encapsula la proteína que va a degradarse, (c) formación de un autolisosoma por fusión de un autofagosoma y un lisosoma, y (d) degradación de la proteína dentro del autolisosoma.

15 Los procesos anteriores (a) a (c) implican factores específicos relacionados con la autofagia. Con respecto a los factores relacionados con la autofagia, la primera investigación se llevó a cabo con levaduras, y hasta el momento se ha identificado un gran número, incluyendo ATG1 a ATG27 (Klionsky *et al.*, *Dev Cell*. 2003; 5 (4): 539-45); la investigación con mamíferos también ha avanzado, se han identificado una pluralidad de homólogos, y el mecanismo molecular central de la autofagia se está aclarando (Yang y Klionsky, *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22 (2): 124-31).

20 Los ejemplos de factores relacionados con la 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 (que se compone de ULK1, ULK2, mAtg13 y RB1CC1), el complejo PI3K (el complejo Atg14L que se compone de Beclin1, hVps34, p150, Ambra1, y Atg14L, y el complejo UVRAG que se compone de 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.

25 Por tanto, los ejemplos del fármaco que suprime la autofagia incluyen, pero no se limitan a, un fármaco que suprime la producción y/o la actividad de un factor relacionado con la autofagia tal como los descritos anteriormente y un fármaco para promover la degradación y/o la inactivación de un factor relacionado con la autofagia (cuando el factor relacionado es un complejo, también se incluye no sólo el complejo en sí mismo sino los componentes individuales que lo forman). Los ejemplos del fármaco que suprime la producción de un factor relacionado con la autofagia incluyen una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido o un polinucleótido de quimera de ADN/ARN para el ADN que codifica para un factor relacionado con la autofagia o un vector que lo expresa.

30 Los ejemplos del fármaco que suprime la actividad de un factor relacionado con la 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 la autofagia (por ejemplo, un anticuerpo para un factor relacionado con la autofagia, etc.) y un mutante negativo dominante de un factor relacionado con la autofagia. Estos fármacos están disponibles comercialmente o pueden producirse de manera adecuada basándose en técnicas conocidas.

35 Desde el punto de vista de la alta especificidad y los bajos efectos secundarios, el fármaco que suprime la autofagia es preferiblemente una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido o un polinucleótido quimera de ADN/ARN para el ADN que codifica para un factor relacionado con la autofagia o un vector que lo expresa.

40 La supresión de la autofagia puede determinarse observando que la autofagia se suprime en las células en comparación con un caso en el que no se utiliza el agente supresor de la autofagia. La supresión de la autofagia puede evaluarse basándose en cualquier técnica conocida, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, detección de un autofagosoma mediante un método de microscopía electrónica y detección de un marcador de autofagia (por ejemplo, Atg5, Atg12, LC3, en particular LC3-II, etc.). LC3-II puede detectarse, por ejemplo, sin limitarse a, usando un anticuerpo específico para LC3-II, o puede detectarse sometiendo una muestra a separación con electroforesis, etc., y detectando después LC3-II, que se separa 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 con tanto LC3-I como LC3-II. Además, dado que LC3-I se dispersa en el citoplasma mientras que LC3-II se localiza en una estructura específica de la autofagia, tal como una membrana de aislamiento, un autofagosoma o un autolisosoma, puede usarse la presencia o el número de señales similares a manchas 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 de la autofagia.

45 La presente divulgación también se refiere a un agente o una composición para suprimir la autofagia en células en las que se suprime GST- π (también denominado “agente supresor de la autofagia” o “composición supresora de la

autofagia”), conteniendo el agente o la composición como principio activo un fármaco que suprime RB1CC1.

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

Cuando se usa en el presente documento, “GST- π suprimida” incluye, por ejemplo, un estado en el que GST- π está suprimiéndose en las 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 las células que expresan GST- π .

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

La presente divulgación se refiere además a un procedimiento para producir un agente o una composición para suprimir la autofagia en células en las que GST- π está suprimida, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime RB1CC1; el uso de un fármaco que suprime RB1CC1 en la producción de un agente o una composición para suprimir la autofagia en células en las que GST- π está suprimida; un fármaco que suprime RB1CC1 para su uso en la supresión de la autofagia en células en las que se suprime GST- π ; y un método para suprimir la autofagia en células en las que se suprime GST- π , comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de un fármaco que suprime RB1CC1.

El agente o la composición para suprimir la autofagia es útil en el tratamiento de un estado asociado con una autofagia potenciada en condiciones en las que se suprime GST- π . Los ejemplos de un estado de este tipo incluyen, pero no se limitan a, un estado en el que se degrada la expresión o la activación de GST- π y un estado en el que se administra un fármaco que suprime la expresión o la activación de GST- π .

Por tanto, la presente divulgación también se refiere a una composición para tratar un estado asociado con una autofagia potenciada en condiciones en las que se suprime GST- π , conteniendo la composición como principio activo un fármaco que suprime RB1CC1; un procedimiento para producir una composición farmacéutica para tratar un estado asociado con una autofagia potenciada en condiciones en las que se suprime GST- π , comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime RB1CC1; uso de un fármaco que suprime RB1CC1 en la producción de una composición farmacéutica para tratar un estado asociado con la autofagia potenciada en condiciones en las que GST- π está suprimida; un fármaco que suprime RB1CC1 para su uso en el tratamiento de un estado asociado con la autofagia potenciada en condiciones en las que GST- π está suprimida; y un método para tratar un estado asociado con la autofagia potenciada en condiciones en las que GST- π está suprimida, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de un fármaco que suprime RB1CC1 a un sujeto que lo requiere.

La cantidad de formulación del principio activo en el agente o la composición relacionada con la supresión de la autofagia puede ser una cantidad que logre la supresión de la autofagia cuando se administra el agente o la composición. Además, es preferible una cantidad que no provoque un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo es conocida o puede determinarse adecuadamente mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas, etc., o un ensayo 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 supresión de la autofagia puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas, incluyendo las descritas anteriormente. La cantidad de principio activo de la formulación 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 debe formularse en una unidad de la composición puede ser la que se obtiene 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 llevarse a cabo adecuadamente por un experto en la técnica.

El fármaco y la cantidad de formulación del mismo en el procedimiento de producción o el uso del agente o la composición relacionados con la supresión de la autofagia son tal como se describieron anteriormente. La formulación de cada fármaco puede llevarse a cabo según cualquier técnica conocida.

Todos los métodos relacionados con la supresión de la 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 logre un efecto deseado (es decir, la supresión de la autofagia) en las células a las que se administra. Además, es preferible una cantidad que no provoque un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo es conocida o puede determinarse adecuadamente 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. La consecución de un efecto deseado puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas, incluyendo las descritas anteriormente. La cantidad eficaz mencionada anteriormente no tiene que ser necesariamente una que induzca un efecto deseado en todas las células de una población celular a la que se administre el fármaco. Por ejemplo, la cantidad eficaz anterior puede ser una cantidad

que induzca un efecto deseado en, de la población celular, 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.

5 Cuando el principio activo en los diversos agentes o composiciones, métodos de tratamiento, etc., descritos en el presente documento es un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido quimera de ADN/ARN, etc., puede usarse como ácido nucleico desnudo tal cual, pero también puede transportarse por diversos vectores. Como vector, puede usarse cualquier vector conocido, tal como un vector plásmido, un vector fago, un vector fagémido, un vector cósmido o un vector viral. El vector contiene preferiblemente al menos un promotor que potencia la expresión del ácido nucleico transportado, y en este caso el ácido nucleico está preferiblemente unido operativamente a un promotor de este tipo. Que el ácido nucleico esté unido operativamente a un promotor significa que el ácido nucleico y el promotor están situados de manera que una proteína codificada por el ácido nucleico se produzca adecuadamente por la acción del promotor. El vector puede ser replicable 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 al genoma de una célula huésped.

Además, el principio activo puede transportarse por diversos portadores lipídicos o proteicos no virales. Los ejemplos de tales portadores 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 un polímero; puede potenciarse la eficiencia de la incorporación en las células (véase, por ejemplo, Pirollo y Chang, *Cancer Res.* 2008; 68 (5): 1247-50, etc.). En particular, es útil un liposoma catiónico o un polímero (por ejemplo, polietilenimina, etc.). Otros ejemplos de polímeros útiles como portadores incluyen los descritos en los documentos US 2008/0207553, US 2008/0312174, etc.

25 Con respecto a las diversas composiciones farmacéuticas usadas por 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 afectado. Los ejemplos de un componente opcional de este tipo incluyen otro agente químico terapéutico, un portador 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 temporizada, o puede incorporarse a un sistema apropiado de liberación del fármaco.

Los diversos agentes y composiciones (incluyendo las diversas composiciones farmacéuticas) descritos en el presente documento pueden administrarse por diversas vías, incluyendo tanto las vías oral como parenteral, por ejemplo, sin limitación, las vías oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intratumoral, rectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosa, transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intrapulmonar e intrauterina, y pueden formularse en una forma de dosificación adecuada para cada vía de administración. Con respecto a tales formas de dosificación y métodos de formulación, puede emplearse adecuadamente cualquier forma o método conocido (véase, por ejemplo, Hyojun Yakuzaijaku (Standard Pharmaceutical Science), Ed. de 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 la 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 del uso. Una formulación para administración parenteral puede estar en forma de una disolución o suspensión estéril isotónica acuosa o no acuosa.

Los diversos agentes o composiciones (incluyendo diversas composiciones) 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, una técnica tal como direccionamiento pasivo en el que una formulación se elabora en un tamaño de 50 a 200 μm de diámetro, en particular de 75 a 150 μm , etc., que es adecuado para la exhibición de un efecto EPR (permeabilidad y retención mejoradas), o el direccionamiento activo en el que un ligando de CD19, HER2, un receptor de transferrina, un receptor de ácido fólico, un receptor VIP, EGFR (Torchilin, *AAPS J.* 2007; 9 (2): E128-47), RAAG10 (JP, A (PCT) 2005-532050), PIPA (JP, A (PCT) 2006-506071), o KID3 (JP, A (PCT) 2007-529197), etc., puede usarse un péptido que tenga un motivo RGD o un motivo NGR, F3, LyP-1 (Ruoslahti *et al.*, *J Cell Biol.* 2010; 188 (6): 759-68), etc., como agente de direccionamiento. Además, dado que se sabe que un retinoide o un derivado del mismo es útil como agente de direccionamiento para las células cancerosas (documento WO 2008/120815), también puede usarse un portador que contenga un retinoide como agente de direccionamiento. Tales portadores se describen en la bibliografía anterior, así como en los documentos WO 2009/036368, WO 2010/014117, WO 2012/170952, etc. Se conocen diversos métodos para la unión de una molécula de direccionamiento (por ejemplo, Torchilin, *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4 (2): 145-60, Nobs *et al.*, *J Pharm Sci.* 2004; 93 (8): 1980-92, Marcucci y Lefoulon, *Drug Discov Today.* 2004; 9 (5): 219-28, etc.), y un experto en la técnica puede hacer que diversos agentes o composiciones de la presente invención (incluyendo diversos tipos de composiciones) tengan propiedades de direccionamiento usando una molécula de direccionamiento basada en la información anterior.

Los diversos agentes o composiciones (incluyendo las diversas composiciones farmacéuticas) descritos en el presente documento pueden suministrarse en cualquier forma y, desde el punto de vista de la estabilidad de almacenamiento, pueden proporcionarse en una forma que pueda prepararse en el momento de su uso, por ejemplo, una forma que permita a un médico y/o farmacéutico, a un enfermero, a otro paramédico, etc., prepararla en el centro médico o en sus proximidades. Una forma de este tipo es especialmente útil cuando el agente o la composición contiene un componente difícil de almacenar de manera estable, tal como un lípido, una proteína o un ácido nucleico. En este caso, el agente o la composición 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 más preferiblemente inmediatamente antes de su uso. Al llevar a cabo la preparación, pueden usarse, según sea apropiado, un reactivo, un disolvente, un equipo de preparación, etc., que suelen estar disponibles en el lugar de preparación.

Por tanto, tal como se define en la reivindicación 5 adjunta, la presente invención también se refiere a un kit o envase para preparar una composición, conteniendo el kit o envase uno o más recipientes, conteniendo el recipiente individualmente o en combinación principios activos que van a contenerse en los diversos agentes o composiciones de la presente invención; y constituyentes esenciales de los diversos agentes o composiciones proporcionados en la forma de dicho kit o envase. El kit o envase de la presente invención puede incluir, además de lo anterior, instrucciones tales como, por ejemplo, instrucciones de uso relacionadas con un método de preparación, un método de aplicación (por ejemplo, un método de administración, etc.), etc., para los diversos agentes o composiciones de la presente invención, por ejemplo, una instrucción por escrito o un medio grabado que contenga instrucciones, por ejemplo, un medio de grabación electrónico tal como un disco flexible, un CD, un DVD, un disco blue-ray, una tarjeta de memoria o una memoria USB. Además, el kit o envase de la presente invención puede contener todos los constituyentes para completar los diversos agentes o composiciones de la presente invención, pero no tiene que contener necesariamente todos los constituyentes. Por tanto, el kit o envase de la presente invención no necesita contener un reactivo o un disolvente que normalmente está disponible en un centro médico, un laboratorio experimental, etc., tal como agua estéril, solución salina fisiológica o una disolución de glucosa. El kit o envase de la presente invención puede usarse en las diversas aplicaciones descritas anteriormente relacionadas con el agente o la composición de la presente invención, por ejemplo, la inducción de la apoptosis, la supresión de la proliferación celular, el tratamiento de una enfermedad en la que hay una apoptosis anómala, la supresión de la autofagia o el tratamiento de un estado asociado con una autofagia potenciada en condiciones en las que se suprime GST- π .

La cantidad eficaz en los diversos métodos de tratamiento descritos en el presente documento es, por ejemplo, una cantidad que reduce los síntomas de una enfermedad o retrasa o detiene la evolución de una enfermedad, y es preferiblemente una cantidad que suprime o cura una enfermedad. También es preferible una cantidad que no provoque un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo puede determinarse adecuadamente 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 la conoce un experto en la técnica o puede determinarse adecuadamente mediante las pruebas descritas anteriormente, etc.

La dosis específica del principio activo que va a administrarse en el método de tratamiento descrito en el presente documento puede determinarse teniendo en cuenta diversas condiciones relacionadas con el sujeto que requiere el tratamiento, como por ejemplo la gravedad de los síntomas, el estado de salud general del sujeto, la edad, el peso corporal, el sexo del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de la administración, los fármacos concomitantes, la capacidad de respuesta al tratamiento, la forma de dosificación y el cumplimiento del tratamiento.

Los ejemplos de la vía de administración incluyen diversas vías, tanto orales como parenterales, tales como las 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 usados y de la condición del sujeto, incluyendo las descritas 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 varios días (es decir, cada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete días, etc.), cada semana, cada varias 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 sano o afectado por alguna enfermedad, pero cuando intenta tratarse una enfermedad específica, significa normalmente un sujeto afectado por dicha enfermedad o que está en riesgo de estar afectado.

Además, cuando se usa en el presente documento, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervenciones preventivas y/o terapéuticas médicamente permitidas con el fin de curar, remitir temporalmente, prevenir, etc., una enfermedad. Por ejemplo, el término "tratamiento" incluye intervenciones médicamente permitidas para diversos tipos de propósitos, que incluyen retrasar o detener la evolución de una enfermedad, hacer que una lesión retroceda o

desaparezca, prevenir la aparición o inhibir la recidiva.

Ejemplos

- 5 La presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos, pero sólo son ilustraciones y no deben interpretarse como una limitación de la presente invención.

Ejemplo 1: inactivación de GST- π y RB1CC1 mediante ARNip

- 10 Se sembraron 1×10^5 células PANC-1 (derivadas de carcinoma pancreático humano) en una placa de 6 cm, y se realizó el cultivo en Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Sigma-Aldrich), al que se le añadió suero bovino fetal al 10% (suero bovino fetal, FBS) y L-glutamina al 5%, durante 18 horas. Las condiciones de cultivo fueron 37°C y el 5% de CO₂, a menos que se especifique lo contrario. Además, se sembraron 1×10^6 células MIA PaCa-2 (derivadas de carcinoma pancreático humano) y $0,5 \times 10^5$ células A549 (derivadas de carcinoma pulmonar humano)
- 15 en una placa de 6 cm, y se realizó el cultivo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich), al que se añadió FBS al 10% y L-glutamina al 10%, durante 18 horas. Se reemplazaron los respectivos medios con Opti-MEM® (Life Technologies), y se transfectaron células MIA PaCa-2, PANC-1 o A549 con del 20% al 30% de confluencia con ARNip de GST- π y/o ARNip RB1CC1 usando Lipofectamine® RNAiMAX (Life Technologies).
- 20 Se preparó una disolución mixta de Lipofectamine®/ARNip para la transfección tal como sigue. En primer lugar, se mezclaron 35 μ l de Lipofectamine® RNAiMAX y 965 μ l de Opti-MEM® para preparar una disolución de Lipofectamine®. Posteriormente, se diluyó una cantidad predeterminada de ARNip 50 μ M en 1 ml con Opti-MEM® para preparar así una disolución de ARNip (por ejemplo, al preparar una disolución de ARNip con una concentración final de 50 nM para su uso, se mezclaron 6 μ l de ARNip 50 μ M y 994 μ l de Opti-MEM®), y esta se mezcló con la disolución de
- 25 Lipofectamine® y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Como ARNip, se usaron los siguientes.

ARNip de GST- π :

hebra sentido: 5' GGGAGGCAAGACCUUCAUUt 3' (SEQ ID No: 1)

hebra antisentido: 5' AAUGAAGGUCUUGCCUCCtg 3' (SEQ ID No: 2)

- 30 ARNip de RB1CC1:

hebra sentido: 5' GGGACGGAUACAAAUCCAAt 3' (SEQ ID No: 3)

hebra antisentido: 5' UUGGAUUUGUAUCCGUCCag 3' (SEQ ID No: 4)

ARNip de control:

hebra sentido: 5' ACGUGACACGUUCGAGAAAt 3' (SEQ ID No: 5)

hebra antisentido: 5' UUCCGAACGUGUCACGUt 3' (SEQ ID No: 6)

- 35

(En las secuencias anteriores, las letras mayúsculas indican ARN y las letras minúsculas indican ADN)

- Con el fin de comprobar el efecto cuando se utilizaban al mismo tiempo ARNip de GST- π y ARNip de RB1CC1, se añadió una concentración final de 50 nM de ARNip de GST- π o ARNip de RB1CC1 o una concentración final de 30 nM de ARNip de GST- π y 20 nM de ARNip de RB1CC1 cuando se utilizaban al mismo tiempo el ARNip de GST- π y el ARNip de RB1CC1 a una placa que contenía células PANC-1, A549, o MIA PaCa-2 reemplazadas con 5 ml de Opti-MEM®, se llevó a cabo el cultivo a 37°C durante 5 horas, y luego se reemplazó el medio (RPMI 1640 que contenía FBS al 5% para las células PANC-1, DMEM que contenía FBS al 10% para las células MIA PaCa-2 y A549). Después de 5 días, se despegaron las células y se recogieron de la placa mediante un tratamiento con tripsina, y se contó el número de células. No se hizo actuar el ARNip en un grupo no tratado (sin tratamiento); después de la siembra de células, se llevó a cabo el cultivo a 37°C durante 6 días, se despegaron las células y se recogieron de la placa mediante un tratamiento con tripsina, y se contó el número de células. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2 y en la figura 1. Las tablas 1 y 2 muestran el grado de proliferación celular como un aumento de la ampliación del número de células sembradas, y la figura 1 muestra el grado de proliferación celular como un número relativo cuando el grupo no tratado es 100.
- 50

[Tabla 1]

	Sin tratamiento	si-GSTP1 50nM	si-GSTP1 30 nM + si-RB1CC1 20nM
--	-----------------	---------------	------------------------------------

MIA PaCa-2	47,9	1,2	0,8
PANC-1	21,2	1,9	1,6
A549	114,6	20,6	10,1

[Tabla 2]

	Sin tratamiento	si-RB1CC1 50nM
MIA PaCa-2	57,6	5,6
PANC-1	18,0	3,4
A549	182,8	72,4

5 Además, se llevó a cabo el mismo experimento anterior para las células MDA-MB-231 (derivadas de carcinoma de mama humano) y las células M7609 (derivadas de carcinoma de colon humano). Se sembraron 1×10^5 células MDA-MB-231 en una placa de 6 cm y se cultivaron en DMEM con FBS al 10% y L-glutamina al 10% durante 18 horas; a continuación, se reemplazó el medio con Opti-MEM®, se utilizaron diversos tipos de ARNip durante 5 horas y, posteriormente, se reemplazó el medio con DMEM que contenía FBS al 10%; después de 5 días se recogieron las células y se contó el número de células. Se sembraron 1×10^5 células M7609 en una placa de 6 cm y se cultivaron en RPMI 1640 que contenía FBS al 10% y L-glutamina al 5% durante 18 horas, luego se reemplazó el medio con Opti-MEM®, se utilizaron diversos tipos de ARNip durante 5 horas, posteriormente se reemplazó el medio con RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, después de 5 días se recogieron las células y se contó el número de células. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. La figura 2 muestra el grado de proliferación celular como un aumento de la ampliación del número de células sembradas, y la figura 3 muestra el número de células recogidas en el momento de finalizar el experimento.

A partir de estos resultados, puede observarse que la doble inactivación de GST- π y RB1CC1 aumentó el efecto de supresión de la proliferación celular más que cuando se inactivó una cualquiera de ellas.

20

Ejemplo 2: supresión de la autofagia mediante la doble inactivación de GST- π y RB1CC1

Se investigó el efecto sobre la autofagia de la doble inactivación de GST- π y RB1CC1. Se sembraron 1×10^6 células MIA PaCa-2 en una placa de 6 cm y se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10% y L-glutamina al 10% durante 24 horas. Se reemplazó el medio con 5 ml de Opti-MEM®, se añadieron a las placas ARNip de GST- π , ARNip de RB1CC1 y una disolución mixta de ARNip de GST- π y ARNip de RB1CC1, preparada de la misma manera que en el ejemplo 1, de manera que cada ARNip tuviera una concentración final de 30 nM, y se cultivó a 37°C durante 5 horas; a continuación, se reemplazó el medio con DMEM que contenía FBS al 10%, y se cultivó durante 3 días. Se lavaron las células en la placa con PBS helado, y a continuación se añadió un tampón de lisis helado para romper las células. Se preparó el tampón de lisis mezclando 100 μ l de alternativa de NP-40, detergente PROTEIN GRADE®, disolución al 10%, esterilizada por filtración (Merck Millipore), 500 μ l de Tris-HCl 1 M (pH 7,5), 300 μ l de NaCl 5 M, 20 μ l de EDTA 0,5 M y 9,08 μ l de agua estéril. Se recogió el lisado celular usando un raspador de células y se enfrió en hielo durante 30 minutos. Durante este procedimiento, se llevó a cabo un mezclado por inversión cada 10 minutos. Se sometió la disolución así obtenida a centrifugación a 15000 rpm y 4°C durante 15 minutos, y se recogió el sobrenadante, obteniéndose así un extracto celular. Se sometió este extracto celular a un análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se llevó a cabo una reacción con una membrana de transferencia a 4°C durante 16 horas usando el anticuerpo anti-LC3B (Sigma-Aldrich) como anticuerpo primario. Se llevó a cabo la detección de las moléculas de LC3 usando un reactivo quimioluminiscente después de una reacción con un anticuerpo secundario marcado con HRP. Si se indujo o no autofagia se evaluó mediante un desplazamiento a LC3 tipo I (18 kDa) y tipo II (16 kDa).

40

A partir de los resultados mostrados en la figura 4, puede observarse que la autofagia se indujo mediante inactivación de GST- π .

Se sembraron 1×10^6 células MIA PaCa-2 en una placa de 6 cm y se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10% y L-glutamina al 10% durante 24 horas. Se reemplazó el medio con 5 ml de Opti-MEM®, se añadieron a las placas ARNip de GST- π , ARNip de RB1CC1 y una disolución mixta de ARNip de GST- π y ARNip de RB1CC1, preparada de la misma manera que en el ejemplo 1, de manera que cada ARNip tuviera una concentración final de 30 nM, y se llevó a cabo el cultivo a 37°C durante 5 horas; a continuación, se reemplazó el medio con DMEM que contenía FBS al 10%, y se cultivó durante 3 días. Se aspiró el medio de la placa, se añadió 1 ml de PFA (paraformaldehído)/PBS al 4% y se dejó reposar la mezcla durante de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Después de aspirar el PFA/PBS, se añadió 1 ml de Triton X-100/PBS al 0,5% y se dejó reposar la mezcla durante 5 minutos en un bloque de hielo. Después de aspirar el Triton X-100/PBS, se añadieron 2 ml de PBS y se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos en un bloque de hielo. Se llevó a cabo una reacción usando un anticuerpo anti-LC3B (Invitrogen) como anticuerpo primario a 37°C durante 1 hora. Se llevó a cabo lavado con PBS, Tween® 20/PBS al 0,05% y PBS en ese orden durante 5 minutos

50

5 cada uno. Se llevó a cabo una reacción con un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor® 488 (Life Technologies) como anticuerpo secundario a 37°C durante 1 hora. Se llevó a cabo el lavado usando PBS, Tween® 20/PBS al 0,05% y PBS en ese orden durante 5 minutos cada uno. Se llevó a cabo el montaje con Pro Long® Gold (Life Technologies). Después de dejar reposar en la oscuridad durante la noche, se examinó la fluorescencia derivada de Alexa Fluor® 488 con un microscopio de fluorescencia.

10 A partir de los resultados mostrados en las figuras 5 a 7, puede observarse que la autofagia inducida por inactivación de GST- π (señal de punto fuerte en la figura 6) se suprimió sustancialmente por completo mediante la doble inactivación de RB1CC1 (figura 7). Además, dado que se observó fragmentación del núcleo mediante la doble inactivación de GST- π y RB1CC1 (mostrado por la flecha en la figura 7), puede suponerse que la supresión de la autofagia que se había inducido mediante inactivación de GST- π mediante la doble inactivación de RB1CC1 indujo la apoptosis.

15 Ejemplo 3: inducción de la apoptosis mediante la doble inactivación de GST- π y RB1CC1

20 Se llevó a cabo un examen para comprobar si la apoptosis se induciría por la doble inactivación de GST- π y RB1CC1. Se sembraron 1×10^6 células MIA PaCa-2 en una placa de 6 cm y se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10% y L-glutamina al 10% durante 24 horas. Se reemplazó el medio con 5 ml de Opti-MEM®, se añadieron a las placas ARNip de GST- π , ARNip de RB1CC1 y una disolución mixta de ARNip de GST- π y ARNip de RB1CC1, preparada de la misma manera que en el ejemplo 1, de manera que cada ARNip tuviera una concentración final de 30 nM, y se cultivó a 37°C durante 5 horas; a continuación, se reemplazó el medio con DMEM que contenía FBS al 10%, y se cultivó durante 3 días. Se lavaron las células de la placa con PBS helado, y a continuación se añadió un tampón de lisis helado para romper así las células. Se preparó el tampón de lisis mezclando 100 μ l de alternativa de NP-40, detergente PROTEIN GRADE®, disolución al 10%, esterilizada por filtración, 500 μ l de Tris-HCl 1 M (pH 7,5), 300 μ l de NaCl 5 M, 20 μ l de EDTA 0,5 M y 9,08 μ l de agua estéril. Se recogió el lisado celular usando un raspador de células y se enfrió en hielo durante 30 minutos. Durante este procedimiento, se llevó a cabo un mezclado por inversión cada 10 minutos. Se sometió la disolución así obtenida a centrifugación a 15000 rpm y 4°C durante 15 minutos, y se recogió el sobrenadante, obteniéndose así un extracto celular. Se sometió este extracto celular a un análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se llevó a cabo una reacción con una membrana de transferencia a 4°C durante 16 horas usando el anticuerpo anti-caspasa-3 escindida (Sigma-Aldrich) como anticuerpo primario. Se llevó a cabo la detección de las moléculas de caspasa-3 escindida usando un reactivo quimioluminiscente después de una reacción con un anticuerpo secundario marcado con HRP. Se evaluó si se indujo o no la apoptosis mediante la cantidad de aumento de la caspasa-3 escindida. Dado que la caspasa-3 se escindió y se activó en el momento de la inducción de la apoptosis, la presencia de caspasa-3 escindida (Caspasa-3 Escindida) puede ser un indicador de la apoptosis.

35 A partir de los resultados mostrados en la figura 8, puede observarse que la apoptosis se indujo mediante la doble inactivación de GST- π y RB1CC1. A partir de los resultados de las figuras 4 a 8, puede observarse que la apoptosis se indujo mediante la supresión de la autofagia, inducida mediante inactivación de GST- π , mediante la doble inactivación de RB1CC1.

40 **Lista de secuencias**

<110> Nitto Denko Corporation

45 <120> Agente inductor de la apoptosis

<130> PCT2684ND

<150> Documento JP 2014-124782

50 <151> 17-06-2014

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

55 <210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: hebra sentido de ARNip de GST- π

<400> 1

65 gggaggcaag accucaut t

ES 2 899 211 T3

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: hebra antisentido de ARNip de GST-pi
 10 <400> 2
 aaugaagguc uugccucct g 21

 <210> 3
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: hebra sentido ARNip de RB1CC1
 20 <400> 3
 gggacggaua caaauccaat t 21

 <210> 4
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: hebra antisentido ARNip de RB1CC1

 <400> 4
 uuggauuugu auccguccca g 21

 35 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: hebra sentido ARNip de control

 <400> 5
 45 acgugacacg uucggagaat t 21

 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50

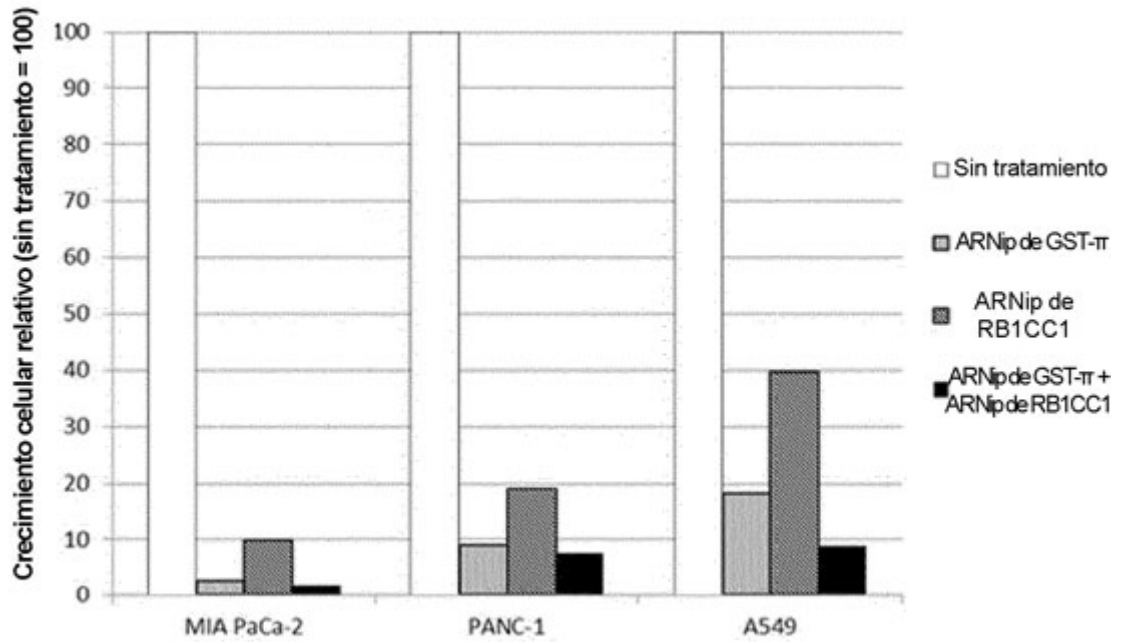
 <220>
 <223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: hebra antisentido de ARNip de control

 <400> 6
 55 uucuccgaac gugucacgut t 21

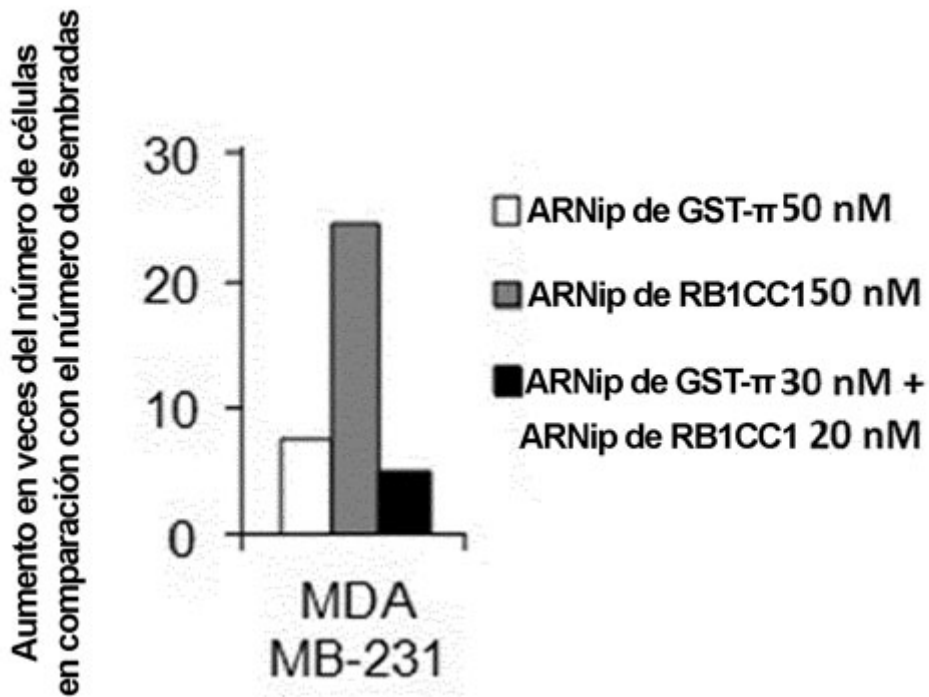
REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad en la que hay una apoptosis anómala, comprendiendo la composición como principios activos un fármaco que suprime la glutatión S-transferasa (GST- π) y un fármaco que suprime la proteína en superhélice 1 inducible por RB1 (RB1CC1),
5 en la que la enfermedad es un cáncer, y
10 en la que el fármaco que suprime RB1CC1 se selecciona del grupo que consiste en una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido, un polinucleótido quimera de ADN/ARN para el ADN que codifica para RB1CC1, un vector que lo expresa, un anticuerpo anti-RB1CC1 y un mutante negativo dominante de RB1CC1.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, 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 quimera de ADN/ARN para el ADN que codifica para GST- π , un vector que lo expresa, un anticuerpo anti-GST- π y un mutante dominante negativo de GST- π .
15
3. Procedimiento para producir la composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo el procedimiento formular como principios activos un fármaco que suprime GST- π y un fármaco que suprime RB1CC1.
20
4. Procedimiento para producir la composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo el procedimiento una etapa de formular un fármaco que suprime RB1CC1.
25
5. Kit o envase para preparar la composición según la reivindicación 1 ó 2, conteniendo el kit o envase uno o más recipientes, conteniendo el recipiente individualmente o en combinación los principios activos que van a contenerse en la composición.

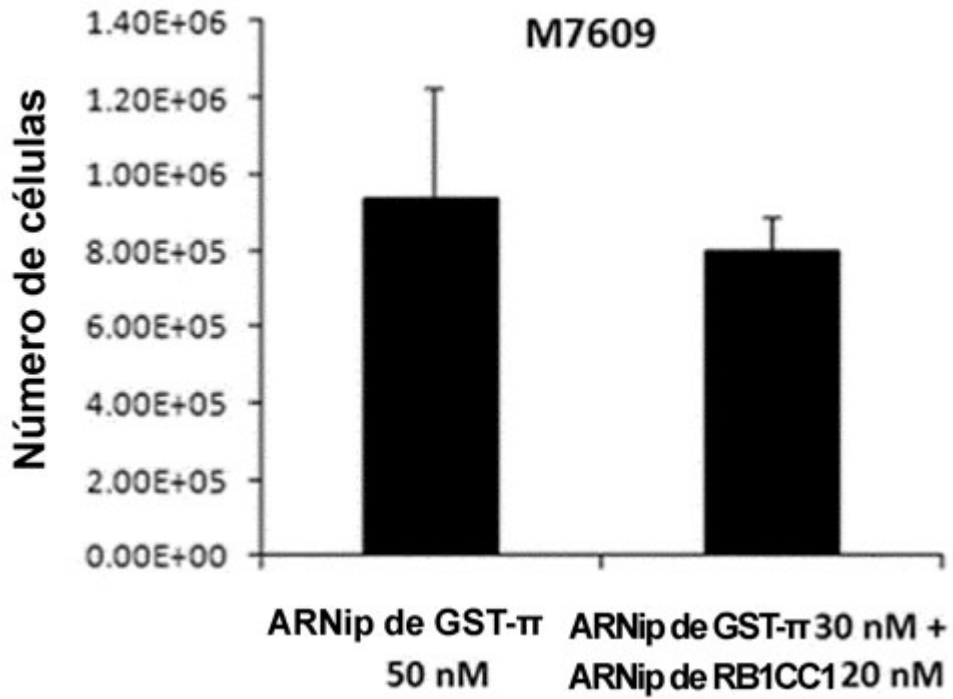
[FIG. 1]



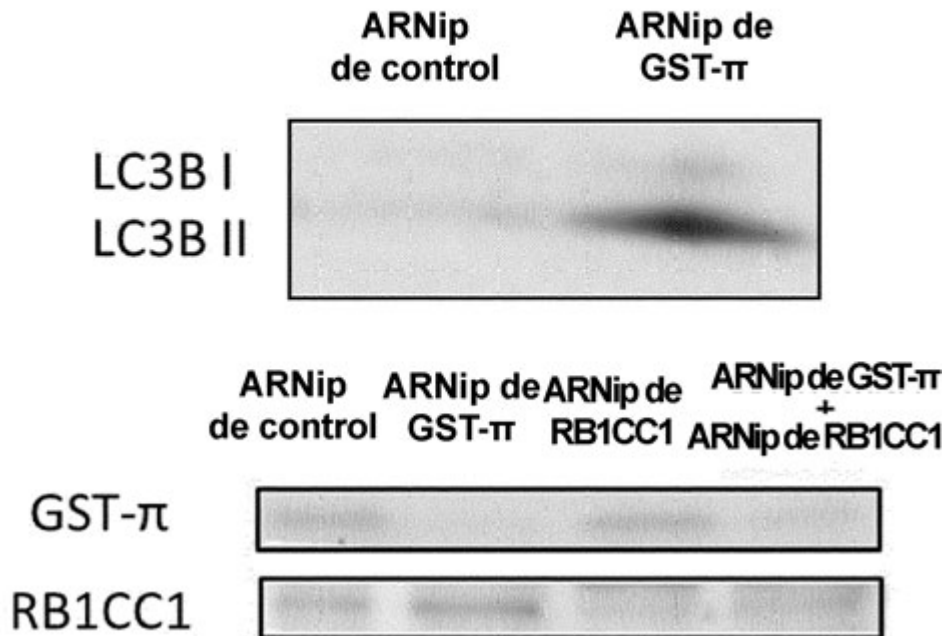
[FIG. 2]



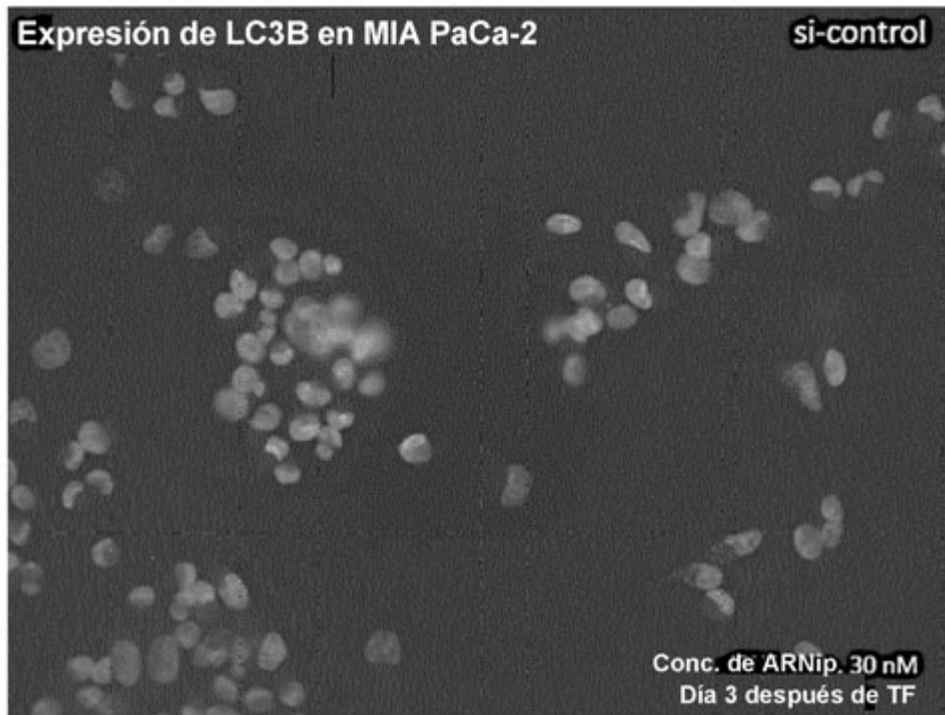
[FIG. 3]



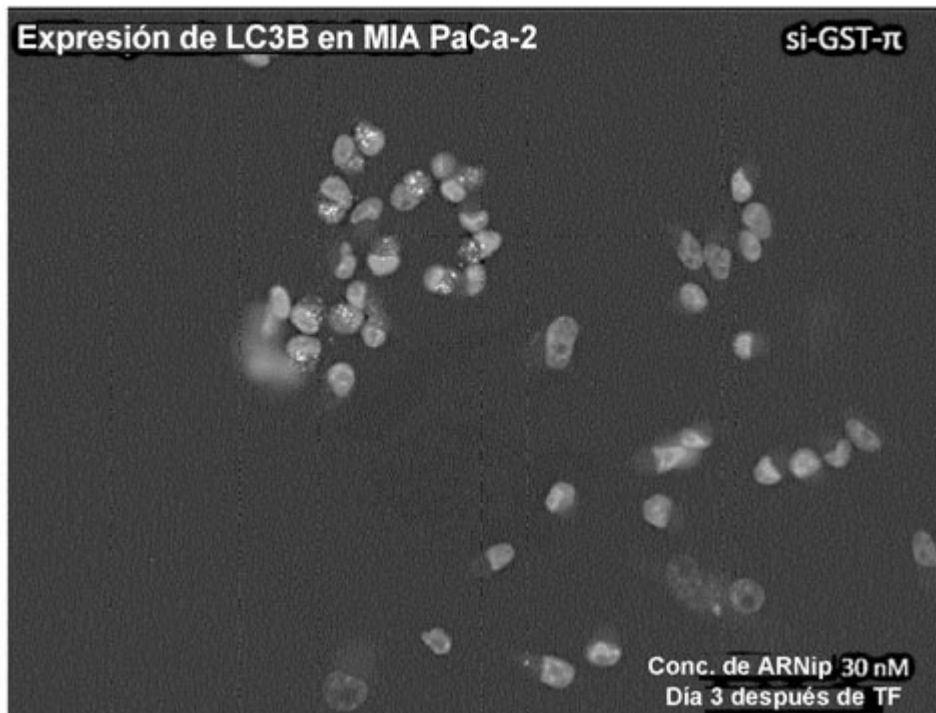
[FIG. 4]



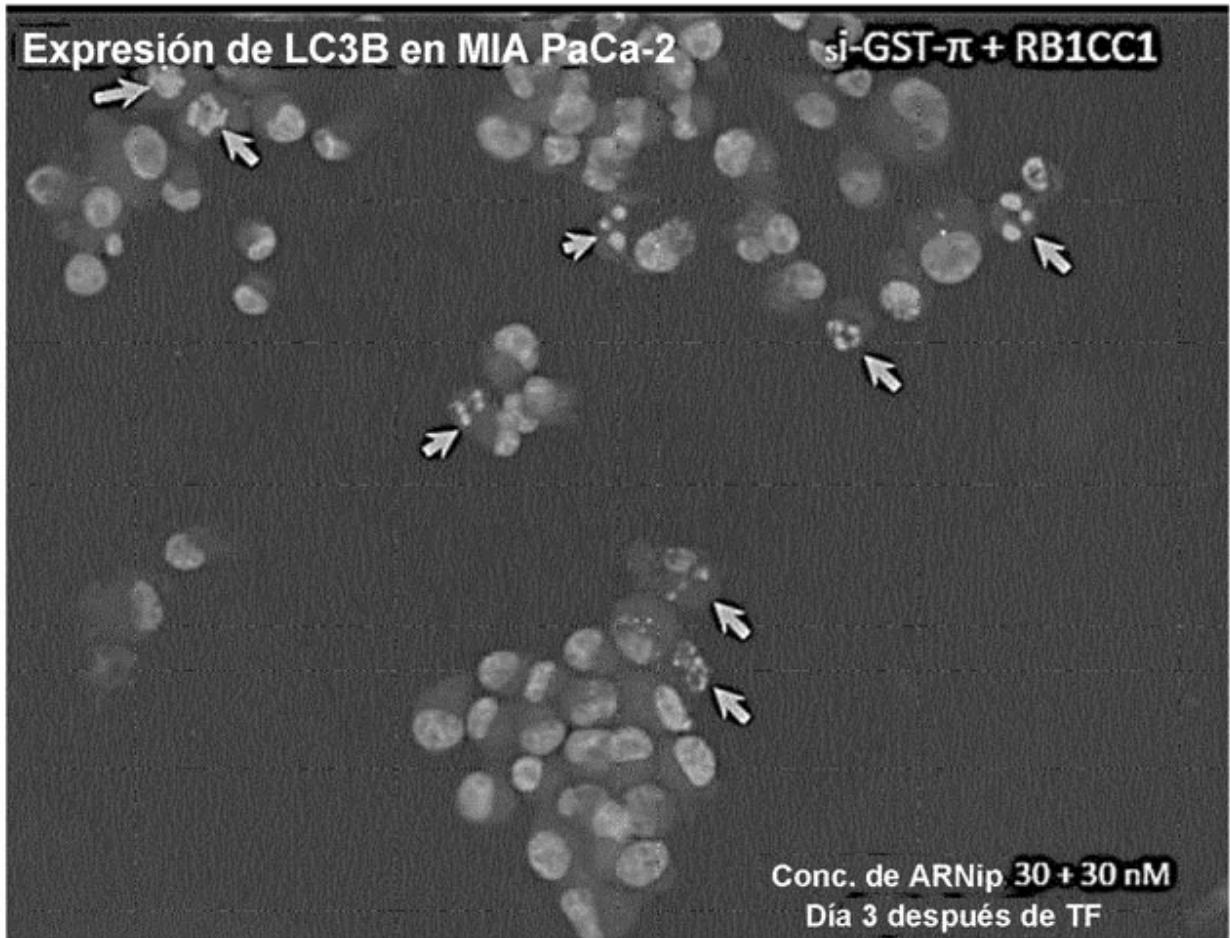
[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]



[FIG. 8]

