



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 580**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03020344 .2**
96 Fecha de presentación : **09.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1454628**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **Uso de p38/JTV-1 para tratar el cáncer.**

30 Prioridad: **03.03.2003 KR 10-2003-0013058**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.07.2009

73 Titular/es: **Neomics Co., Ltd.**
nº 307 105-1 dong, Seoul National University
San 56-1 Shillim-dong, Kwanak-gu
Seoul 151-742, KR

72 Inventor/es: **Kim, Sunghoon y**
Park, Bum-Joon

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 323 580 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

Uso de p38/JTV-1 para tratar el cáncer.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo uso de p38/JTV-1. Más concretamente, esta invención se refiere a una proteína p38/JTV-1 para uso como medicamento, un ácido nucleico que codifica dicha proteína y un procedimiento para seleccionar una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer caracterizado por la selección de una sustancia que tiene un efecto sobre el aumento de actividad de la proteína p38/JTV-1 y el nivel intracelular de la misma.

Antecedentes de la invención

El cáncer se refiere a un grupo de células que muestran sobreproliferación debido a la descoordinación del crecimiento y proliferación de las células debido a la pérdida de la capacidad de diferenciación de las células. La mayor parte de los cánceres se producen por carcinogénesis multietapa ya que la mutación de oncogenes y de los genes supresores del tumor se produce a través de 5-8 etapas y finalmente se generan células cancerosas. Se ha sabido que la activación de oncogenes que inducen un cáncer induce la proliferación anormal de células y la activación de los genes supresores del tumor suprime dicha proliferación anormal de células y bloquea la generación de células cancerosas por la muerte de las células específicas mediante la activación del programa de muerte celular.

Hasta la fecha, como genes asociados con la generación de cáncer, se han encontrado 100 genes o más. Los oncogenes típicos incluyen genes H-ras, N-ras, K-ras, c-myc y N-myc. Estos oncogenes se distribuyen ampliamente por todos los cromosomas en seres humanos, y la mutación de estos genes ocasiona la proliferación anormal de células, que se desarrollan a continuación en las células cancerosas. Entre estas, se observó la sobreexpresión de c-myc en diversos cánceres en seres humanos, por ejemplo en el 80% de cánceres de mama, 70% de cánceres de colon, 90% de cánceres ginecológicos y 50% de cánceres hepatocelulares. Además, se sabe que la sobreexpresión anormal de c-myc está asociada con tumor de la sangre, cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de gónadas, cáncer de colon, adenocarcinoma, leucemia promielocítica, fibroblastoma desmoplásico, carcinoma de células escamosas, mielocitoma y así sucesivamente.

Como genes supresores tumorales típicos que suprimen la proliferación anormal de células, se pueden mencionar p53, p16, p21, p24 y p27. Los genes supresores tumorales suprimen la división y proliferación anormal de células y también tienen la función de reparar los ADN celulares cuando se dañan y se sabe que están asociados con la regulación de la apoptosis y la proliferación de células para evitar que el ADN se amplifique sin limitación.

Los intentos de tratar cánceres usando oncogenes y los genes supresores tumorales que se han identificado recientemente están bajo progreso activo. Esto es, se han intentado diversas terapias incluyendo la inhibición de la actividad de los oncogenes desarrollando compuestos capaces de infraregular los oncogenes sobreexpresados y desarrollando genes de sentido contrario contra el oncogén, o la sustitución *in vivo* de los oncogenes dañados por genes normales. Además, se han desarrollado factores que inducen la apoptosis de células cancerosas de diversas maneras como agentes anticancerosos.

Entretanto, se ha conocido p38/JTV-1 como un factor auxiliar de los complejos de proteínas de las aminoacil-ARNt sintetasas (ARS) en eucariotas superiores (Quevillon S. y col., J. Mol. Biol., 285: 183-195, 1999). Debido a que las ARS son enzimas que catalizan la unión de los aminoácidos específicos con su ARNt análogo, se supone que p38/JTV-1 tiene una función asociada con la síntesis de proteínas. Además, el gen que codifica p38/JTV-1 se localiza en el cromosoma 7 humano y se dispone frente por frente con el gen que codifica PSM2 que está implicado en la reparación de los errores de emparejamiento del ADN (Kolodner R. D. y col, Curr. Opin. Gene. Dev., 9:89-96, 1999). La proteína p38/JTV-1 que está codificada por el gen p38/JTV-1 comprende 320 restos de aminoácidos en ratón y comprende 312 restos de aminoácidos en el ser humano, y se conocen sus secuencias (Quevillon S. y col., J. Mol. Biol., 285: 183-195, 1999). La proteína p38/JTV-1 es una proteína hidrófoba y se supone que contiene el motivo cremallera de leucina, que es una región asociada con la interacción proteína-proteína (Quevillon S. y col., J. Mol. Biol. 8: 285(1), 183-95, 1999). Se ha informado también de la p38/JTV-1 con otro nombre, la proteína JTV-1 (Nicolaidis y col., Genomics, 29: 329-334, 1995). Sin embargo, no se conocen hasta la fecha las funciones exactas de p38/JTV-1.

Los inventores de la presente invención han hallado en el curso de realización de los experimentos para identificar las funciones de p38/JTV-1, que la unión de p38/JTV-1 con la FBP (proteína de unión FUSE) promueve la transcripción de c-myc y la unión con la PDK-1 (quinasa dependiente de fosfoinositido) en la ruta AKT-P13K de regulación de la apoptosis. Basándose en dichos hallazgos, los inventores identificaron que la p38/JTV1 tiene nuevas actividades de supresión de la proliferación de células infraregulando c-myc a través de la interacción con FBP y de promover la apoptosis inhibiendo la fosforilación de AKT (serina/treonina quinasa) a través de la interacción con PDK-1, e identificaron también que la p38/JTV-1 podría ser útil como supresor tumoral en virtud de dichas características y de acuerdo con esto, los inventores han completado la invención sujeto.

Resumen de la invención

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar una proteína p38/JTV-1 para uso como medicamento.

5 Otro objeto de la invención es proporcionar un ácido nucleico aislado que codifique dicha proteína para uso como medicamento.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprenda la proteína p38/JTV-1 o el ácido nucleico que codifica ésta.

10

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para seleccionar una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer caracterizado por la selección de una sustancia que tiene un efecto sobre el aumento de la actividad de la proteína p38/JTV-1 y el nivel intracelular de la misma.

15 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el resultado del ensayo de dos híbridos de levadura para la selección de proteínas celulares que interactúan con p38/JTV-1 (colonia azul: interacción positiva).

20 La Fig. 2 es el resultado del inmunoemborronado que muestra los niveles de c-myc, FBP y p38/JTV-1 en los pulmones del ratón de tipo natural y el ratón mutante deficiente en p38/JTV-1. Se usó tubulina como control de carga (ratón de tipo natural +/+, ratón mutante heterocigótico +/-, y ratón mutante homocigótico -/-).

25 La Fig. 3 es el resultado del inmunoemborronado que muestra el cambio en FBP y c-myc de acuerdo con el aumento de la expresión del gen p38/JTV-1.

30 La Fig. 4a es el resultado del inmunoemborronado llevado a cabo usando el anticuerpo anti-FBP (izquierda) y un anticuerpo anti-ubiquitina (derecha) tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-FBP, que muestra el grado de la ubiquinación de FBP de acuerdo con el aumento de la expresión de un gen p38/JTV-1 (IB: inmunoemborronado, usando los anticuerpo anti-FBP y el anti-ubiquitina, FBP-Ubi: FBP ubiquitinado).

35 La Fig. 4b muestra los resultados obtenidos transfectando células con el plásmido que codifica el gen de la Ubiquitina etiquetado con HA y el plásmido que codifica el gen p38/JTV-1, inmunoprecipitándolos con el anticuerpo anti-FBP e inmunoemborronando los precipitados con el anticuerpo anti-Ha (IP: inmunoprecipitación, usando el anticuerpo anti-FBP, IB: inmunoemborronado, usando el anticuerpo anti-Ha, WCL: lisado celular completo, -: no contiene HA-plásmido de la Ubiquitina, +: contiene HA-plásmido de la ubiquitina).

40 La Fig. 5a muestra los resultados obtenidos transfectando células 293 con el plásmido que codifica los fragmentos de delección de p38/JTV-1 etiquetados con myc y el plásmido que codifica el FBP etiquetado con HA, inmunoprecipitándolos con el anticuerpo anti-myc y ensayándolos mediante inmunoemborronado usando el anticuerpo anti-FBP (IP: inmunoprecipitación, usando el anticuerpo anti-myc, WB: inmunoemborronado, usando el anticuerpo anti-FBP, WCL: lisado celular completo, flechas: péptidos presentes en los vectores que se unen a p38/JTV-1 cuando se expresa p38/JTV-1).

45 La Fig. 5b muestra los resultados obtenidos transfectando células 293 con el plásmido que codifica los fragmentos de delección de p38/JTV-1 y el plásmido que codifica la HA-ubiquitina inmunoprecipitándola con el anticuerpo anti-FBP e inmunoemborronando el precipitado con el anticuerpo anti-HA (IP: inmunoprecipitación, usando el anticuerpo anti-FBP, WB: inmunoemborronado, usando el anticuerpo anti-HA).

50 La Fig. 5c es el resultado del ensayo de la RT-PCR que muestra el efecto de unos fragmentos de la delección de p38/JTV-1 sobre la expresión de c-myc (GAPDH: control de carga, C-myc: control).

La Fig. 5d muestra la capacidad de unión de FBP, la ubiquinación de FBP y la regulación de c-myc de los fragmentos de delección de p38/JTV-1.

55

La Fig. 6 es el resultado del inmunoemborronado obtenido usando cada anticuerpo específico, que muestra el cambio en el nivel de expresión de p38/JTV-1, FBP y c-myc como intervalo de tiempo tras el tratamiento de TGF- β 2 en células A549.

60 La Fig. 7 es un esquema que muestra el mecanismo de regulación de c-myc mediante p38/JTV-1 (línea continua: promoción, línea punteada: supresión).

La Fig 8a es el resultado del inmunoemborronado que muestra el nivel de expresión de los PI3K y AKT fosforilados en tejidos aislados procedentes de un ratón de tipo natural y un ratón deficiente en p38/JTV-1 (ratón de tipo natural +/+, ratón deficiente en p38/JTV-1 -/-).

65

La Fig. 8b es el resultado del inmunoemborronado que muestra el nivel de expresión de los PI3K y AKT fosforilados en células de fibroblasto embrionario de un ratón de tipo natural y un ratón deficiente en p38/JTV-1 (WT: células

de fibroblasto embrionario de ratón de tipo natural, p38/JTV-1 -/-: células de fibroblasto embrionario de ratón deficiente en p38/JTV-1).

La Fig. 9a es el resultado del inmunoemborronado que muestra el nivel de expresión de AKT, PDK-1, AKT total y los miembros de la familia Bcl-2 fosforilados de acuerdo con el aumento del nivel de expresión de p38/JTV-1 en la línea celular HCT 116.

La Fig. 9b es el resultado del inmunoemborronado que muestra el nivel de expresión los AKT y PDK-1 fosforilados en la línea celular HCT116 transfectada con un vector de expresión p38/JTV-1 como intervalo de tiempo.

La Fig. 10 es el resultado de la inmunoprecipitación que muestra la interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1 (IP: inmunoprecipitación, usando los anticuerpos anti-IgG, anti-PDK-1, anti-AKT y anti-PI3K, WB: inmunoemborronado, usando los anticuerpos anti-PI3K, anti-AKT, anti PDK-1 y anti-p38/JTV-1).

La Fig 11a es un esquema que muestra unos fragmentos de la delección de PDK-1 que comprenden la región de la quinasa y la región PH.

La Fig. 11b es el resultado del inmunoemborronado que muestra la interacción entre los fragmentos de la delección de PDK-1 y p38/JTV-1 (EV: células en las que se introduce el ADNpc, WT: células de tipo natural, IP: inmunoprecipitación, usando el anticuerpo anti-FLAG).

La Fig 12a es el resultado del inmunoemborronado que muestra el nivel de expresión de la AKT fosforilada y el cambio en la expresión de p38/JTV-1 de acuerdo con el tratamiento de los ligandos de muerte.

La Fig. 12b es el resultado del ensayo de inmunoprecipitación que muestra el cambio en la interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1 de acuerdo con el tratamiento de los ligandos de muerte (IP: inmunoprecipitación, tratamiento con el anticuerpo anti PDK-1, control: sin tratamiento con los ligandos de muerte).

La Fig 13 es un esquema que muestra el mecanismo de regulación de la apoptosis mediante p38/JTV-1 (flechas: promoción, en forma de T: supresión).

La Fig 14 muestra el efecto de p38/JTV-1 sobre la proliferación de células en líneas celulares cancerosas (HCT116: carcinoma colorrectal humano, HeLa: cáncer cervical, A549: carcinoma epitelial de pulmón).

La Fig. 15a es el resultado del inmunoemborronado que muestra la liberación del Citocromo C de acuerdo con el tratamiento de los ligandos de muerte y la introducción de p38/JTV-1 en líneas celulares cancerosas (-: no añadido, +: añadido).

La Fig. 15b muestra el número de células muertas por apoptosis de acuerdo con el tratamiento de ligandos de muerte y la introducción de p38/JTV-1 en líneas celulares cancerosas, en términos de porcentaje con respecto a los números totales de células (TNF-: sin tratamiento con TNF, TNF+: tratamiento con TNF, ADNpc: células en las que se introduce el ADNpc, p38/JTV-1; células en las que se introduce el gen p38/JTV-1).

Descripción detallada de la invención

Con el fin de conseguir el objeto anteriormente mencionado, la presente invención proporciona una proteína p38/JTV-1 para uso como medicamento.

También, para conseguir otro objeto de la invención, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica dicha proteína para uso como medicamento.

También, para conseguir otro objeto de la invención, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína p38/JTV-1 o el ácido nucleico que codifica ésta.

También, para conseguir otro objeto de la invención, la invención proporciona un procedimiento para seleccionar una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer caracterizado por la selección de una sustancia que tiene el efecto de aumentar la actividad de la proteína p38/JTV-1 y el nivel celular de la misma.

La invención se describirá adicionalmente en detalle.

Los inventores identificaron nuevas funciones del gen p38/JTV-1 del que se ha sabido que tiene un papel crítico en la actividad y la estabilidad de la formación de las aminoacil-ARNt-sintetasas (ARS), que no se conocían hasta la fecha. Los inventores observaron que todos los ratones que eran deficientes en el gen p38/JTV-1 murieron a los dos días desde su nacimiento y examinaron la causa de la muerte en ratones. Como resultado, pudieron identificar que la deficiencia del gen p38/JTV-1 no tenía efecto sobre la síntesis de las proteínas pero inducía la sobreexpresión de las células alveolares. Además, se observó que en ratones deficientes en el gen p38/JTV-1, el número de células muertas por apoptosis disminuyó en comparación con los ratones de tipo natural (no se muestran los datos). A este respecto, los inventores supusieron que p38/JTV-1 podría tener nuevas funciones que no se conocían hasta la fecha en relación

con la inhibición de la proliferación celular y la apoptosis, así como su función ya conocida como factor auxiliar de las ARS.

Para identificar nuevas funciones de p38/JTV-1, los inventores seleccionaron las proteínas de unión que se unen a p38/JTV-1 usando el ensayo de dos híbridos de levadura. Como resultado del experimento observaron que p38/JTV-1 interactúa específicamente con FBP (proteína de unión a FUSE) que une el elemento de la secuencia lejana en la dirección 5' de cadena única (FUSE) localizado aproximadamente 1,5 kb en la dirección 5' del promotor c-myc (Duncan R. y col., *Genes Dev.*, 8, 465-480, 1994) (véase la Fig. 1). Esta interacción entre p38/JTV-1 y FBP podría identificarse además mediante la purificación por afinidad y la inmunoprecipitación (no se muestran los datos).

Se conoce la FBP (proteína de unión a Fuse) por ser una proteína que induce la expresión de c-myc uniéndose a la FUSE localizada en la dirección 5' del promotor c-myc activado. De acuerdo con esto, la FBP se denomina regulador de unión con el ADN de la expresión de c-myc (DROME) (M. I. Avigan y col., *J. Biol. Chem.*, 265, 18538-18545, 1990). Recientemente, se ha informado de que la actividad de FBP podría regularse negativamente mediante FIR (supresor de la interacción con FBP) (Liu J. y col., *Mol. Cell*, 5, 331-341, 2000). En este caso, se sabe que FIR forma un complejo junto con FBP en el ADN de FUSE para reprimir la expresión dependiente del activador de c-myc.

Por tanto, los inventores investigaron qué funciones de la interacción entre p38/JTV-1 y FBP que se habían encontrado de nuevo en esta invención podrían llevarse a cabo en relación con la expresión de c-myc usando un ratón deficiente en p38/JTV-1.

En una forma de realización de la invención, se extrajeron las proteínas de tejidos de pulmón en un ratón deficiente en p38/JTV-1 y en un ratón de tipo natural y se llevó a cabo su inmunoemborronado usando anticuerpos específicos contra FBP, p38/JTV-1 y c-myc. Como resultado, el nivel de FBP y c-myc fue mayor en el ratón mutante deficiente en p38/JTV-1 en comparación con aquellos en el ratón de tipo natural (véase la Fig. 2). A partir de dichos resultados, se supuso que p38/JTV-1 podría tener un efecto sobre la reducción en el nivel intracelular de FBP y c-myc.

Para confirmar dicha suposición, se examinó el cambio en el nivel intracelular de FBP y c-myc de acuerdo con el aumento de la expresión p38/JTV-1 en otra forma de realización de la invención. Como resultado, el nivel intracelular de FBP y c-myc disminuyeron a medida que aumentó el nivel de expresión de p38/JTV-1 (véase la Fig. 3).

En otra forma de realización de la invención, se investigó si p38/JTV-1 estaba mediado con la ubiquinación de FBP. Como resultado, se observaría que la ubiquinación de FBP estaba asociada con el proteosoma 26S y la p38/JTV-1 promovía la ubiquinación de FBP (véase la Fig. 4a y la Fig 4b).

Además, los inventores construyeron los fragmentos de delección de p38/JTV-1 e investigaron una región que interactuaba con FBP. Como resultado, se observaría que la interacción de p38/JTV-1 y FBP estaba asociada con la región N terminal de p38/JTV-1. También, podría observarse que el fragmento p38/JTV-1 promovió la ubiquinación de FBP mediante la unión con FBP y de esta manera se suprimió la expresión de c-myc (véase la Fig. 5a ~ Fig. 5d).

Además, en otra forma de realización de la invención, se examinó el efecto de TGF- β 2 sobre la expresión de p38/JTV-1. Como resultado, la expresión de p38/JTV-1 aumentó mediante el tratamiento de TGF- β 2 (véase la Fig. 6). Consecuentemente, los presentes inventores identificarían el mecanismo de regulación de TGF- β 2 \rightarrow p38/JTV-1 \rightarrow FBP \rightarrow c-myc en el que TGF- β 2 aumenta la expresión de p38/JTV-1 y la p38/JTV-1 expresada promueve la ubiquinación de FBP mediante la unión con FBP y de esta manera infrarregula la expresión de c-myc (véase la Fig. 7).

Además, los presentes inventores encontraron que en tejidos aislados procedentes de un ratón deficiente en p38/JTV-1, se redujo significativamente el número de células que mostraban apoptosis en comparación con las de un ratón de tipo natural y se ensayaron para identificar la relación entre p38/JTV-1 y el mecanismo de regulación de la apoptosis.

Como mecanismo importante de regulación de la apoptosis de las células y la supervivencia de las células *in vivo*, se conoce la ruta AKT-PI3K (Kulik y col., *Mol. Cell Biol.*, 17(3): 1595-1606, 1997; Franke y col., *Cell*, 188(4): 435-437, 1997; Kauffmann-Zeh y col., *Nature*, 385 (6616): 544-548, 1997; Hemmings, *Science*, 275 (5300): 628-630, 1997). Los factores de supervivencia de las células, por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) inducen la actividad de PI3K. El PI3K activado induce la generación de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PtdIns (3,4,5)-P3), y los PtdIns (3,4,5)-P3 se unen a AKT, que es una serina/treonina quinasa y producen a continuación la translocación de AKT desde el citoplasma a la membrana celular. Debido a esto, se produce la fosforilación en la treonina en el residuo del aminoácido número 308 (Thr 308) y de la serina en el residuo de aminoácido número 473 (Ser473) de AKT. El AKT fosforilado inhibe la apoptosis y promueve la supervivencia de las células. Recientemente, se ha identificado una proteína quinasa PDK-1 funcionando como fosforilante de la Thr308, pero no se había identificado todavía una quinasa fosforilante de la Ser473 (Stokeo y col., *Science*, 277: 567-570, 1997; Stephens y col., *Science*, 279: 710-714, 1998).

Por tanto, para examinar la relación entre p38/JTV-1 y la ruta AKT-PI3K, en una forma de realización de la invención, los inventores aislaron diversos tejidos de un ratón deficiente en p38/JTV-1 e investigaron el nivel de

expresión de los AKT y PI3K fosforilados usando el inmunoemborronado. Como resultado, los niveles de expresión de PI3K y AKT total en ratón deficiente en p38/JTV-1 no mostraron diferencias de los del ratón de tipo natural mientras que la expresión de la AKT fosforilada (p-AKT) en un ratón deficiente en p38/JTV-1 aumentó en comparación con el del ratón de tipo natural (véanse la Fig. 8a y la Fig. 8b).

Para examinar más concretamente la relación entre p38/JTV-1 y la actividad de AKT, se investigaron un aumento en la expresión de p38/JTV-1 en las líneas celulares cancerosas y un cambio en la expresión de los factores asociados con la ruta AKT-PI3K durante el intervalo de tiempo en otra forma de realización de la invención. Como resultado, cuando aumentó la expresión de p38/JTV-1, se redujo la expresión de la AKT fosforilada (p-308 y p-473) y pDK-1, mientras que la expresión de los miembros de la familia Bcl-2 y el AKT total no mostraron cambios (véase la Fig. 9a). También, aumentó la supresión de la fosforilación de AKT por la p38/JTV-1 de una forma dependiente del tiempo (véase la Fig 9b). Estos resultados apoyan que la p38/JTV-1 es un nuevo regulador negativo en la activación de AKT.

En otra forma de realización de la invención, se examinó la interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1 a través del ensayo de dos híbridos de levadura y la inmunoprecipitación. Como resultado, se observó una fuerte interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1. Por otra parte, no hubo interacción entre p38/JTV-1 y PI3K (véanse la Fig 10a y la Fig 10b).

Podría confirmarse la interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1 analizando la tendencia de la interacción entre los fragmentos de la delección de PDK-1 y p38/JTV-1. Es decir, el fragmento completo de p38/JTV-1 y PDK-1 mostró una fuerte interacción, mientras que cuando se eliminó la región de la quinasa de PDK-1, que tiene una actividad de fosforilación de AKT, el fragmento restante y p38/JTV-1 no mostraron interacción (véanse la Fig. 11a y la Fig. 11b). A partir de esto, podría decirse que la p38/JTV-1 bloqueó la fosforilación de AKT uniéndose a la región de la quinasa de PDK-1.

En otra forma de realización de la invención, se investigó el nivel de expresión de p38/JTV-1 en las líneas celulares cancerosas de acuerdo con el tratamiento de FasL y TNF, que son ligandos de muerte que promueven la apoptosis. Como resultado se observó que, de acuerdo con el tratamiento de los ligandos de muerte, aumentó la expresión de p38/JTV-1, disminuyó la fosforilación de AKT debido al aumento de la expresión de p38/JTV-1 y aumentó la interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1 (véanse la Fig. 12a y la Fig. 12b).

A partir de los resultados de los experimentos anteriores, los presentes inventores encontraron de forma novedosa el mecanismo de que la expresión de p38/JTV-1 está promovida por un ligando de muerte y la p38-JTV-1 suprime la fosforilación de AKT a través de la interacción con PDK-1, promoviendo por tanto la apoptosis (véase la Fig. 13).

De acuerdo con esto, la p38/JTV-1, que se conocía meramente como un factor auxiliar de las ARS, se puede considerar como un supresor tumoral novedoso que promueve la apoptosis así como un supresor de la sobreproliferación de células a través de la interacción con FBP y PDK-1. Los inventores investigaron el grado de apoptosis y el grado inhibidor de la proliferación celular de acuerdo con el aumento de la expresión de p38/JTV-1 en las líneas celulares cancerosas, para confirmar el uso de p38/JTV-1 como supresor tumoral.

En una forma de realización de la invención, se investigó el grado de proliferación celular transfectando una línea celular de carcinoma colorrectal humano, una línea celular de cáncer cervical y una línea celular de carcinoma epitelial de pulmón con el plásmido de expresión p38/JTV-1. Como resultado se observó que cuando aumento el nivel de expresión del gen p38/JTV-1, se suprimió significativamente la proliferación de células cancerosas (véase la Fig. 14).

Además, en otra forma de realización de la invención, se determinaron el grado de liberación del Citocromo C y el grado de apoptosis de las células transfectando una línea celular de cáncer cervical con un plásmido de expresión p38/JTV-1. Como resultado, aumentó el grado de liberación del Citocromo C y la apoptosis en el interior de las células en comparación con el caso en el que no se introdujo el gen p38/JTV-1. También, podría observarse que aumentó la apoptosis mediante el tratamiento del ligando de muerte (véanse la Fig. 15a y la Fig. 15b). A partir de esto se confirmó que se podría usar p38/JTV-1 como agente anticanceroso promoviendo la apoptosis.

Por tanto, la presente invención proporciona una proteína p38/JTV-1 para uso como medicamento.

La proteína p38/JTV-1 de acuerdo con la presente invención se refiere a una proteína p38/JTV-1 natural o recombinante, o las proteínas con actividad fisiológica sustancialmente equivalente. Las proteínas con actividad fisiológica sustancialmente equivalente incluyen equivalentes funcionales y derivados funcionales de la proteína p38/JTV-1 natural/recombinante.

Los “equivalentes funcionales” se refieren a aquellos que tienen una actividad fisiológica sustancialmente equivalente a la de la proteína p38/JTV-1 de tipo natural, como los modificadores de la secuencia de aminoácidos en los que se sustituye una parte o todas de los aminoácidos de la proteína natural, o se elimina o añade una parte de los aminoácidos. Los “derivados funcionales” se refieren a aquellos que tienen una actividad fisiológica sustancialmente equivalente a la de la proteína p38/JTV-1 de tipo natural, como las proteínas modificadas para aumentar o reducir las propiedades fisicoquímicas de la proteína p38/JTV-1.

ES 2 323 580 T3

La proteína p38/JTV-1 de la invención se deriva preferiblemente de mamíferos y más preferiblemente, seres humanos. Se conoce la secuencia de aminoácidos de la proteína p38/JTV-1 (número de acceso del Genbank: U24169).

Preferiblemente, la proteína p38/JTV-1 de la invención comprende los aminoácidos seleccionados entre el grupo constituido por: (a) los aminoácidos representados por la SEC DE ID N°4; (b) los aminoácidos del aminoácido 84 al 161 de la SEC DE ID N°4; (c) los aminoácidos representados por la SEC DE ID N°5; y (d) los aminoácidos representados por la SEC DE ID N°6.

La proteína p38/JTV-1 de la invención se puede usar para (a) suprimir la expresión del gen c-myc promoviendo la ubiquinación de FBP; (b) promover la apoptosis suprimiendo la fosforilación de AKT (serina/treonina quinasa); o (c) tratar cánceres.

Por ejemplo, los anteriores cánceres no se limitan a, pero pueden ser cáncer de mama, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de sangre, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, sarcoma uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer de colon, carcinoma de la trompa de Falopio, carcinoma endometrial, cáncer cervical, cáncer vulvar, carcinoma vaginal, enfermedad de Hodgkin, cáncer esofágico, cáncer de intestino delgado, cáncer endocrino, cáncer de tiroides, cáncer paratiroideo, cáncer adrenal, tumor del tejido blando, cáncer uretral, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia aguda o crónica, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma pélvico renal, tumor del SNC, linfoma del SNC primario, tumor de la médula ósea, gliomas del pedúnculo nervioso cerebral, adenoma de la pituitaria, o una combinación de los mismos.

También, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la proteína p38/JTV-1 para uso como medicamento.

El ácido nucleico que codifica la proteína p38/JTV-1 comprende ADN o ARN. Preferiblemente, esto significa un ADN que codifica la proteína p38/JTV-1 derivada de mamíferos y más preferiblemente, seres humanos. Se conoce el gen p38/JTV-1 humano (N°de acceso del Genbank: U24169).

Preferiblemente, el ácido nucleico de la invención comprende los nucleótidos seleccionados entre el grupo constituido por: (a) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC DE ID N°1; (b) los nucleótidos del 250 al 483 en la SEC DE ID N°1; (c) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC DE ID N°2, y (d) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC DE ID N°3.

Además, dentro del alcance del ácido nucleico de la invención, se pueden incluir los ácidos nucleicos que tienen al menos un 80%, preferiblemente un 90%, o más preferiblemente un 95% o más de homología en la secuencia con el ácido nucleico que codifica la proteína P38/JTV-1 o el ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos complementaria de la misma.

Se puede usar el ácido nucleico de acuerdo con la invención para (a) suprimir la expresión del gen c-myc promoviendo la ubiquinación de FBP; (b) promover la apoptosis suprimiendo la fosforilación de AKT (serina/treonina quinasa); o (c) tratar cánceres.

También, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína p38/JTV-1 y el ácido nucleico que codifica la proteína. Preferiblemente, la composición farmacéutica se caracteriza por (a) suprimir la expresión del gen c-myc promoviendo la ubiquinación de FBP; (b) promover la apoptosis suprimiendo la fosforilación de AKT (serina/treonina quinasa), o (c) tratar cánceres. Los cánceres a los cuales se puede aplicar la composición farmacéutica de la invención son tal como se ha mencionado anteriormente.

Se puede preparar la composición farmacéutica que comprende la proteína p38/JTV-1 de acuerdo con los procedimientos comúnmente usados en diversas formas de dosificación que comprenden además vehículos farmacéuticamente aceptables. El vehículo "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que es fisiológicamente aceptable y no origina reacciones alérgicas tales como trastornos gastrointestinales, mareos, etc., o reacciones similares a las anteriores cuando se administra a seres humanos. Como vehículos farmacéuticamente aceptables, en el caso de la administración oral, se pueden usar un ligante, lubricante, desintegrante, excipiente, solubilizante, agente de dispersión, estabilizante, agente de suspensión, pigmento y aroma, y en el caso del agente de inyección, se puede usar un tampón conservante, agente analgésico, solubilizante, agente isotónico y estabilizante en una forma mezclada, y en el caso de preparaciones para administración local, se puede usar una base, excipiente, lubricante y conservante. Se puede preparar la forma de dosificación de la composición farmacéutica de la invención de diversas maneras mezclando ésta con los vehículos farmacéuticamente aceptables tal como se ha mencionado anteriormente. Por ejemplo, en el caso de la administración oral, se puede formular ésta en forma de comprimido, comprimido grueso, cápsula, elixir, suspensión, jarabe, oblea, etc., y en el caso del agente de inyección, se puede formular éste en forma de ampolla de dosificación unitaria o formas multidosisación.

La composición farmacéutica que comprende la proteína p38/JTV-1 se administra a seres humanos y animales de manera oral, o parenteralmente tal como por vía intravenosa, subcutánea, intranasal o intraperitoneal La administración

oral incluye la aplicación sublingual. La administración parenteral incluye procedimientos de inyección tales como inyección subcutánea, inyección intramuscular e inyección intravenosa, e infusión gota a gota.

Además, el ácido nucleico contenido en la composición farmacéutica de la invención puede estar contenido en el interior de vectores de expresión tales como un plásmido o vector vírico. Se pueden introducir los vectores de expresión en células diana en la forma de expresión mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica pertinente tales como infección o transducción.

El vector de expresión plásmido es el procedimiento de transferencia génica aprobado por la FDA que se puede aplicar a los seres humanos y es un procedimiento de transferencia de un ADN plásmido directamente a células humanas (Nabel, E. G. y col., *Science*, 249: 1285-1288, 1990). El ADN plásmido tiene la ventaja de purificarse homogéneamente, a diferencia del vector vírico. Como vector de expresión plásmido que se puede usar en la presente invención, se pueden usar plásmidos de expresión en mamíferos conocidos en la técnica pertinente. Por ejemplo, no se limita a, pero incluyen normalmente pRK5 (Patente Europea N°307.247), pSV16B (Publicación de Patente Internacional 91/08291 A) y pVL1392 (PharMingen). En una forma de realización de la invención, se usó ADN3pc (Invitrogen).

Se puede introducir el vector de expresión plásmido que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención en células tumorales mediante los procedimientos conocidos en la técnica pertinente, por ejemplo, transfección transitoria, microinyección, transducción, fusión celular, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por liposomas, transfección mediada por dextrano DEAE, transfección mediada por polibreno, electroporación, cañón de genes y otros procedimientos conocidos de introducir ADN en células (Wu y col., *J. Biol. Chem.*, 267: 963-967, 1992; Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 263: 14621-14624, 1988). Preferiblemente, se puede usar el procedimiento de transfección transitoria.

También, el vector de expresión vírica que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención no se limita a, pero incluye retrovirus, adenovirus, virus del herpes y virus avipox.

El vector retroviral está construido de tal manera que se pueden producir proteínas no víricas mediante el vector vírico en el interior de células infectadas mediante la eliminación o modificación de todos los genes víricos. Las principales ventajas del vector retroviral para la terapia génica se basan en el hecho de que se transfieren una cantidad de genes en células replicativas, los genes transferidos en el ADN celular se integran con precisión y no se produce la infección continua tras la transfección génica (Miller, A. D., *Nature*, 1992, 357: 455-460). El vector retroviral aprobado por la FDA se construye usando células del paquete retroviral anfotrópico PA317 (Miller, A. D. y Buttimore, C. *Molec. Cell Biol.*, 6: 2895-2902, 1986).

Como vectores no retrovirales, están los adenovirus que se han mencionado anteriormente (Rosenfeld, M. A., y col., *Cell*, 68: 143-155, 1992; Jaffe, H. A. y col., *Nature Genetics*, 1: 372-378, 1992; Lemarchand, P. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89: 6482-6486, 1992). Las principales ventajas del adenovirus se basan en el hecho de que éste puede transferir una cantidad de fragmentos de ADN (genoma de 36 kb) y es capaz de infectar células no replicativas con un título muy elevado. También se puede usar el virus del herpes con utilidad para la terapia génica humana (Wolfe, J. H., y col., *Nature Genetics*, 1: 379-384, 1992). Además, se pueden usar otros vectores víricos adecuados conocidos en la composición farmacéutica de la invención.

Se puede administrar el vector vírico mediante procedimientos conocidos. Por ejemplo se puede administrar por vía local, parenteral, oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, o mediante otros medios adecuados. Especialmente, se puede inyectar el vector directamente en el cáncer o células tumorales diana en una cantidad eficaz para tratar las células tumorales de un tejido diana. En concreto, en el caso del cáncer o tumor presente en la cavidad corporal tal como ojos, tracto gastrointestinal, órganos genitourinarios, pulmones y sistema bronquial, se puede inyectar la composición farmacéutica de la invención directamente en el órgano hueco afectado por el cáncer o tumor usando una aguja, catéter u otros tipos de tubo de transferencia. Se pueden usar equipos de imagen tales como rayos X, sonograma o un sistema de visualización de fibra óptica para la confirmación de la localización del tejido diana y la inyección de la aguja o catéter. Además, en el caso de tumor o cáncer que no pudiera alcanzarse directa o separadamente mediante los procedimientos de análisis, se puede administrar la composición farmacéutica de acuerdo con la invención en el sistema de circulación sanguínea.

También, la composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención puede comprender además vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos vehículos o excipientes incluyen un agente de dispersión, agente humectante, agente de suspensión, diluyente y carga. Se puede determinar la relación de un vehículo específico farmacéuticamente aceptable y el vector de expresión contenido en la composición farmacéutica de la invención mediante la solubilidad y las propiedades químicas de la composición, el procedimiento específico de administración, etc.

Se puede seleccionar adecuadamente la cantidad terapéutica o preventivamente eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención en función del sujeto que se va a administrar, edad, variación individual y los estados de la enfermedad.

También, como la p38/JTV-1 tiene una actividad de infrarregulación de c-myc, que es un protooncogen, uniéndose a FBP y promoviendo por tanto la ubiquinación de FBP y una actividad de promover la apoptosis uniéndose a PDK-1, e inhibiendo por tanto la fosforilación de AKT, como se identificó mediante la presente invención, se pueden utilizar dichas características de la p38/JTV-1 para seleccionar una sustancia eficaz para el tratamiento y prevención del cáncer.

5

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer caracterizado por comprender las etapas de: (a) cultivar una proteína p38/JTV-1 o una célula recombinante que expresa dicha proteína con una sustancia candidata y (b) determinar el efecto de la sustancia candidata sobre el aumento de la actividad de la proteína p38/JTV-1 o el nivel intracelular de la misma. El aumento de la actividad de la proteína p38/JTV-1 significa el aumento en la capacidad de unión de la proteína p38/JTV-1 con la proteína FBP o PDK-1. El aumento en el nivel intracelular de la proteína p38/JTV-1 significa un aumento en la concentración de la proteína p38/JTV-1 mediante el aumento de la expresión del gen p38/JTV-1 o la inhibición de la degradación de la proteína p38/JTV-1. La expresión del gen p38/JTV-1 comprende la transcripción del gen p38/JTV-1 y el procedimiento de traducción en la proteína. De acuerdo con esto, las sustancias candidatas de la composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer de la invención son aquellas que tienen las características de promover la unión entre la p38/JTV-1 y FBP o la p38/JTV-1 y PDK-1, o el aumento del nivel intracelular de la proteína p38/JTV-1

Como procedimientos para determinar la actividad y el nivel intracelular de la proteína p38/JTV-1, se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica pertinente. Por ejemplo, no se limitan a, pero incluyen la inmunoprecipitación simultánea, el ensayo inmunosorbente unido a enzima, radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica, inmunoemborronado y análisis mediante clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

También, para el procedimiento de selección usando el p38/JTV-1 de la invención como gen diana, se puede aplicar el procedimiento de selección de alto rendimiento (HTS). El HTS es el procedimiento de selección de las actividades biológicas de múltiples sustancias candidatas simultánea o casi simultáneamente ensayando las múltiples sustancias candidatas al mismo tiempo. En una forma de realización específica, se incubaron las líneas celulares en una placa de microvaloración de 96 pocillos o una placa de microvaloración de 192 pocillos en la que se trataron a continuación múltiples sustancias candidatas, y después de eso se puede determinar el nivel de expresión de p38/JTV-1 mediante inmunohistoquímica. En este formato, se llevaron a cabo 96 ensayos independientes al mismo tiempo en una única placa de plástico de 8 cm x 12 cm que contenía 96 pocillos de reacción. Normalmente, el pocillo requiere un volumen de ensayo entre 50 μ l y 500 μ l. Además de las placas, están disponibles numerosos instrumentos, equipos, pipetas, robots, lavadores de placas y lectores de placas para ajustar el formato de 96 pocillos a ensayos amplios homogéneos y heterogéneos.

35

La presente invención se describirá en detalle mediante los ejemplos.

Sin embargo, los siguientes ejemplos ilustran solamente la invención; la materia de la invención no debería construirse limitándose a los anteriores.

40

Ejemplo 1

Regulación del mecanismo de c-myc mediante la interacción entre p38/JTV-1 y FBP

45

Ejemplo 1-1

Selección de las proteínas de unión que interactúan con p38/JTV-1 usando el análisis de dos híbridos de levadura

Como análisis de dos híbridos de levadura, se usó un sistema LexA. La proteína p38/JTV-1 humana y LexA se fusionaron y a continuación se expresaron, y la propia p38/JTV-1, la lisil-ARNt sintetasa (KRS), la proteína de unión con FUSE (FBP), la tritofanil-ARNt sintetasa (WRS), la tirosil-ARNt sintetasa (YRS) y las glutaminil-ARNt sintetetas (QRS) se fusionaron respectivamente con la proteína B-42 y a continuación se expresaron, tras lo cual se seleccionaron las proteínas que interactuaban con la proteína p38/JTV-1.

55

60

Para expresar la proteína de fusión de p38/JTV-1 y LexA, se construyó un plásmido recombinante, pLe-xA-(p38/JTV-1), en el que se introdujo ADNc de p38/JTV-1. Se obtuvo el ADNc de p38/JTV-1 mediante una amplificación mediante PCR usando el cebador directo (SEC DE ID N°7) y el cebador inverso (SEC DE ID N°8) que se muestran en la Tabla 1 a continuación, que se fabricaron a partir de la secuencia de nucleótidos conocida del ADNc de p38/JTV-1 (N°de acceso del Gene Bank: U24169) usando la línea celular Hela de cáncer cervical humano de la biblioteca de ADNc (Clontech) como plantilla. El ADNc anterior obtenido de p38/JTV-1 se digirió con *EcoRI* y *Sall* y se subclonó en los emplazamientos *EcoRI* y *Sall* del vector pLex202 (Invitrogen) para construir por tanto pL-exA-(p38/JTV-1). Se llevaron a cabo 25 ciclos de la PCR con 1 min a 940, 1 min a 570 y 1 min a 720 tras lo cual se desnaturalizó la plantilla de ADN con 940 durante 5 min.

65

ES 2 323 580 T3

Cebadores usados para la amplificación del ADNc de p38/JTV-1		
Cebador	Secuencia	SEC DE ID Nº
Cebador directo p38/JTV-1	CCGGAATTCATGCCGATGTACCAGGTAAG	7
Cebador inverso p38/JTV-1	CCGCTCGAGTAAAAAGGAGCCAGGTTTTC	8

Para expresar la proteína de fusión de las proteínas de unión y B42, se construyeron los plásmidos recombinantes, pB42-(p38/JTV-1), pB42-FBP, pB42-KRS, pB42-WRS, pB42-YRS y pB42-QRS como sigue. El ADNc de p38/JTV-1 preparado en el anterior se insertó en los emplazamientos *ECOR1* y *Xho1* del vector pB41 (Invitrogen) para construir de esta manera el plásmido pB42-(p38/JTV-1). El Dr. D. Levens (National Institutes of Health; NIH, EE.UU) proporcionó el ADNc que codifica la FBP humana de longitud completa (Nº de acceso del Gene Bank: NM_003902), el fragmento de aminoácidos desde el 564 al 645 en la región C terminal se insertó en los emplazamientos *EcoR1* y *Xho1* para construir de esta manera el plásmido pB42-FBP. Los ADNc que codifican KRS, WRS, YRS y QRS se obtuvieron de la digestión de los LexA-KRS, LexA-WRS, LexA-YRS y LexA-QRS que los inventores construyeron anteriormente (Kang J. W. y col., J. Biol. Chem., 275:41, 31682-31688, 2000) con *EcoR1* y *Xho1*. Los ADNc se insertaron en los emplazamientos *EcoR1* y *Xho1* de pB42 para construir de esta manera pB42-KRS, pB42-WRS, pB42-YRS y pB42-QRS.

Usando los plásmidos recombinantes construidos en el anterior, se transformó el EGY48 de *Saccharomyces cerevisiae* (Clontech Laboratories Inc. Estojak y col. (1995)), que tenía un plásmido lacZ (p8op-LacZ) como una sonda génica de acuerdo con los procedimientos conocidos (Golemis, E. A., y col., en Current Protocols in Molecular Biology, 1994). Se ensayó la interacción entre LexA-(p38/JTV-1) y las proteínas de unión expresadas como las formas de fusión con B42 cultivando las cepas de levadura transformadas en las placas YPD que contenían X-gal (Rho S. B. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96, 4488-4493, 1999). La interacción positiva de LexA-(p38/JTV-1) y las proteínas de unión se indica mediante la formación de una colonia azul.

Como resultado, apareció la interacción fuerte y positiva en p38/JTV-1, pero no apareció la interacción de KRS y FBP en la triftofanil-WRS, tirosil-YRS y QRS (Fig. 1). La homodimerización de la p38/JTV-1 era ya conocida, y se conocía ya también que la p38/JTV-1 interactuaba específicamente con KRS. Sin embargo, no se había informado anteriormente del hecho de que la p38/JTV-1 interactúa con FBP y se identificó por primera vez en la invención sujeto.

Ejemplo 1-2

Determinación de los niveles intracelulares de FBP y c-myc en pulmón de ratón mutante deficiente en p38/JTV-1

Se aislaron los pulmones procedentes del ratón de tipo natural (+/+), del ratón mutante heterocigótico, deficiente en solo un alelo p38/JTV-1 (+/-), y del ratón mutante homocigótico, deficiente en ambos alelos p38/JTV-1 (-/-), se extrajeron las proteínas de los pulmones y a continuación se inmunoemborraron las proteínas con los anticuerpos anti-p38/JTV-1, anti-FBP y anti c-myc para analizar por tanto los niveles intracelulares de FBP y c-myc.

Como ratón de tipo natural (+/+), se usó el ratón C57B macho (Samtako) de un día de edad. Se prepararon los ratones mutantes p38/JTV-1 de acuerdo con los procedimientos conocidos (Kim y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 99: 7912-7916).

Se aislaron los pulmones procedentes del ratón de tipo natural y de los ratones mutantes p38/JTV-1, y se extrajeron las proteínas de los pulmones. Los tejidos pulmonares aislados de los ratones se homogeneizaron usando un homogeneizador polytron en tampón Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 10 mM, EDTA 0,5 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM usando un homogeneizador polytron. Se centrifugó el homogenado a 100.000 g durante una hora y se recogieron los sobrenadantes (fracción citosólica), en los que se ajustó Triton X-100 al 0,5% para extraer las proteínas celulares. Las proteínas extraídas se inmunoemborraron usando los anticuerpos anti-p38/JTV-1, anti-FBP y anti c-myc (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) de acuerdo con los procedimientos conocidos (Kim T. y col., J. Biol. Chem., 275: 21786-21772, 2000). Se usó el anticuerpo anti-tubulina (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) como control de carga.

Como resultado, los niveles de FBP y c-myc fueron mayores en los pulmones del ratón mutante homocigótico p38/JTV-1 (-/-) en comparación con aquellos en el ratón de tipo natural (+/+) o el ratón mutante heterocigótico p38/JTV-1 (+/-) (Fig. 2). Este resultado significa que p38/JTV-1 tuvo un efecto de reducir los niveles de FBP y c-myc.

Ejemplo 1-3

Cambio en los niveles intracelulares de FBP y c-myc de acuerdo con el aumento de la expresión de p38/JTV-1

Se investigó el efecto de la expresión de p38/JTV-1 sobre los niveles intracelulares de FBP y c-myc transfectando células 293 de riñón embrionario humano (proporcionadas por la ATCC) con plásmidos p38/JTV-1 que tenían diferentes cantidades. Se transfetaron las células 293 de riñón embrionario humano con 0,5 µg/ml o 2 µg/ml del plásmido de

expresión p38/JTV-1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ del plásmido de expresión FBP, respectivamente. Se construyó el plásmido de expresión p38/JTV-1 insertando el ADNc de p38/JTV-1 del Ejemplo 1 subclonado en los emplazamientos *EcoRI-XhoI* del ADN3pc etiquetado con myc (Invitrogen). Se construyó el plásmido de expresión FBP insertando el ADNc de FBP del Ejemplo 1 subclonado en los emplazamientos *EcoRI-XhoI* del ADN3pc etiquetado con HA (Invitrogen). Después que se transfectaran las células de riñón embrionario humano con el plásmido myc-(p38/JTV-1) anteriormente preparado y el plásmido HA-FBP, se cultivaron a 370 durante 24 horas y se extrajeron las proteínas de estas células mediante el mismo procedimiento que se usó en el Ejemplo 1-2. Las proteínas extraídas se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-HA, anti c-myc y anti-myc (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) (Kim T. y col., J. Biol. Chem., 275: 21768-21772, 2000).

Como resultado, disminuyeron los niveles de expresión de FBP y c-myc y aumentó el nivel de expresión de p38/JTV-1.

Ejemplo 1-4

Ubiquinación de FBP mediada por p38/JTV-1

Para determinar la ubiquinación de FBP, se pretrataron células 293 de riñón embrionario humano (proporcionadas por la ATCC) con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ALLN (N-acetil-leucinal-no-leucinal) durante tres horas, para bloquear la degradación mediada por el proteosoma 26S de las proteínas ubiquitinadas (Zhou M. y col., J. Biol. Chem., 271, 24769-24775, 1996). Después de que se hubieron transfectado estas células con 0,1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ del plásmido de expresión p38/JTV-1 del Ejemplo 1-3, respectivamente, se extrajeron las proteínas de estas células mediante el mismo procedimiento que se usó en el Ejemplo 1-2, y a continuación las proteínas extraídas se inmunoprecipitaron usando el anticuerpo anti-FBP (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.). Las proteínas inmunoprecipitadas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-FBP (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y el anticuerpo anti-ubiquitina (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) (Kim T. y col., J. Biol. Chem., 275: 21768-21772, 2000).

También, las anteriores células 293 se transfectaron simultáneamente con un plásmido HA-ubiquitina (suministrado por el Dr. Sungho Ryu del Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology, Corea) y el plásmido myc-(p38/JTV-1) que tenían una cantidad diferente cada vez. En otras palabras, estas células se transfectaron simultáneamente con un plásmido HA-ubiquitina y 0,1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de plásmido myc-(p38/JTV-1), respectivamente, y a continuación las células obtenidas se lisaron con tampón RIPA (tampón Tris 10 mM pH 7,5, SDS al 0,1%, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato al 0,5%, β -glicerofosfato 45 mM, NaF 50 mM, ditiotretitol 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM) durante 16 horas y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-FBP mediante el mismo procedimiento que se usó en el Ejemplo 1-3. Para determinar la FBP ubiquitinada, se llevó a cabo el inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) (Kim T. y col., J. Biol. Chem., 275: 21768-21772, 2000).

Como resultado, el nivel de FBP no se vio afectado por el cambio de p38/JTV-1 en las células tratadas ALLN. Esto significa que la degradación de FBP está mediada por el proteosoma 26S (Fig. 4a, izquierda). También, además de FBP, se detectaron bandas de elevado peso molecular. Para examinar si estas bandas son la FBP ubiquitinada, se inmunoprecipitaron las proteínas con el anticuerpo anti-FBP y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-ubiquitina. Como resultado, se hicieron reaccionar estas bandas con el anticuerpo anti-ubiquitina. De acuerdo con esto, las bandas de elevado peso molecular podrían confirmarse como la FBP ubiquitinada (Fig 4a, derecha).

Además, los inventores expresaron la HA-ubiquitina exógena y p38/JTV-1 en células 293 con diferentes niveles de p38/JTV-1, y determinaron si la ubiquinación de FBP se había potenciado mediante p38/JTV-1. Como resultado, la FBP ubiquitinada se potenció mediante la expresión simultánea de p38/JTV-1 (Fig. 4b).

En conclusión, podía observarse que el proteosoma 26S medió en la degradación de FBP y p38/JTV-1 medió también en la ubiquinación y degradación de FBP.

Ejemplo 1-5

Efecto de la unión de p38/JTV-1 y FBP sobre la ubiquinación FBP y la supresión de c-myc

Después que se construyeron los fragmentos de delección de p38/JTV-1, se examinó si estos fragmentos de delección se unían a FBP. Se construyó el ADNc que codificaba los aminoácidos 1-312 (longitud completa) de p38/JTV-1 humano usando los cebadores que se muestran en la Tabla 2 a continuación de acuerdo con el mismo procedimiento que se usó en el Ejemplo 1-1. Se obtuvieron los ADNc de los fragmentos de delección que codificaban los aminoácidos 1-161, los aminoácidos 162-312 y los aminoácidos 84-312 de p38/JTV-1 humano mediante una amplificación mediante la PCR usando parejas de cebadores específicos y usando el ADNc completo de p38/JTV-1 como una plantilla. Las parejas de cebadores específicos son como se muestra en la Tabla 2 a continuación. Se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación mediante la PCR con 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C y 5 min a 72°C después que se hubo desnaturalizado la plantilla de ADN con 95°C durante 5 min.

ES 2 323 580 T3

TABLA 2

Secuencia de cebador usada para la construcción de los fragmentos de delección de P38/JTV-1			
Emplazamiento amplificado	Cebador	Secuencia	SEC DE ID N°
Aminoácidos 1-312	Directo	ATGCCGATGTACCAGGTAAAG	9
	Inverso	AAAAGGAGCCAGGTTTTAC	10
Aminoácidos 1-161	Directo	ATGCCGATGTACCAGGTAAAG	9
	Inverso	CACGCTCTTGACCGAGGAGTG	11
Aminoácidos 162-312	Directo	AAACCTTCTCAAGTGCTTTG	12
	Inverso	AAAAGGAGCCAGGTTTTAC	10
Aminoácidos 84-12	Directo	AGATGCAGACTTGGATGTAAC	13
	Inverso	AAAAGGAGCCAGGTTTTAC	10

Cada uno de los ADNc obtenidos se subclonaron en emplazamientos EcoRI-XhoI del ADN3pc etiquetado con myc (Invitrogen). Los plásmidos construidos se transfectaron conjuntamente con el plásmido HA-FBP preparado en el Ejemplo 1-3 anterior, en células 293 de riñón embrionario humano. Las células transfectadas se lisaron con el tampón RIPA durante 16 horas después de la transfección. El lisado celular se hizo reaccionar con anticuerpo anti-myc a 4°C durante 3 horas. Después de añadir una perla de proteína A-agarosa al reactivo anterior, se incubó la mezcla adicionalmente durante 1 hora a 4°C. Se lavó la perla con tampón de lisis cuatro veces. Las proteínas precipitadas se analizaron mediante SDS-PAGE y a continuación se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Se inmunoborronó el inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-myc y el anticuerpo anti-HA (Kim T. y col., J. Biol. Chem., 275: 21768-21772, 2000). De la misma manera se inmunoborronó el lisado celular completo de las células 293 transfectadas con el anticuerpo anti-myc para investigar si o no se expresaba p38/JTV-1.

También, para examinar el efecto de los fragmentos de delección de p38/JTV-1 sobre la ubiquinación de FBP, se transfectaron el plásmido HA-ubiquitina y el plásmido que expresaba el fragmento de la delección de p38/JTV-1 preparado en el anterior en células 293 y a continuación, se llevó a cabo la inmunoprecipitación y el inmunoborronado usando el anticuerpo anti-FBP y el anticuerpo anti-HA de acuerdo con el mismo procedimiento que anteriormente.

Además, se determinó el efecto de los fragmentos de delección de p38/JTV-1 sobre la expresión de c-myc mediante una RT-PCR. Después de que se hubieron transfectado las células 293 con un plásmido que expresaba el fragmento de delección de p38/JTV-1 durante 24 horas, se obtuvo el lisado celular usando 500 µl de ARNsol y 200 µl de cloroformo, y a continuación se extrajo el ARN. Después que se hubo sometido a vortización el lisado celular obtenido, se incubó éste a 4°C durante 10 minutos y a continuación se separaron mediante centrifugación a 4°C, 12.000 rpm. Se añadió al sobrenadante 1 ml de isopropanol y se incubó la disolución a -70°C durante 2 horas y se centrifugó a 4°C, 12.000 rpm durante 30 minutos. Se disolvió el precipitado con agua destilada y se midió la cantidad y la calidad del ARN usando un espectrofotómetro. También, después de extraer 1 µg de ARN del anterior lisado celular, se mezclaron 200 U de transcriptasa inversa MoMuLV, 10 pM de hexámero aleatorio y 10 mM de dNTP, se sometió la mezcla a reacción de transcripción inversa-fusión a 23°C durante 15 min, alargamiento a 42°C durante 60 min y desnaturalización a 95°C durante 5 min, para obtener de esta manera ADNc. El ADNc obtenido se amplificó mediante la PCR de acuerdo con el mismo procedimiento que anteriormente y en esta reacción, se usó GAPDH como control de carga y se usó c-myc como control. Las parejas de cebadores específicos de los ADNc de la delección de p38/JTV-1 son como se muestra en la Tabla 2 anterior y los cebadores para la amplificación de GAPDH y c-myc son como se muestra en la Tabla 3 a continuación. Los productos amplificados mediante la PCR finalmente se sometieron a electroforesis sobre gel de agarosa al 2%, que a continuación se coloreó con bromuro de etidio y se observó bajo rayos UV.

TABLA 3

Cebadores de c-myc y GAPDH usados en la RT-PCR		
Cebador	Secuencia	SEC DE ID N°
Cebador directo de c-myc	cagcagcctcccgcgacgat	14
Cebador inverso de c-myc	agcctggtaggaggccagct	15
Cebador directo de GAPDH	ttccatggcaccgtcaaggc	16
Cebador inverso de GAPDH	cttggcagcgcagtagagg	17

ES 2 323 580 T3

Como resultado, aunque los fragmentos p38/JTV-1 de los aminoácidos 1-312 (longitud completa), los aminoácidos 1-161 y los aminoácidos 84-312 se unieron a FBP, el fragmento p38/JTV-1 de los aminoácidos 162-312 no lo hizo. El inmunoemborronado del lisado celular completo, que no inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-myc demostró que se estaba expresando p38/JTV-1 (Fig. 5a). También, se podría observar que la ubiquinación de FBP fue promovida sólo por los fragmentos de p38/JTV-1 que fueron capaces de unirse a FBP (Fig. 5b). Además, los fragmentos de p38/JTV-1 unidos a FBP suprimieron la expresión de c-myc y el fragmento de delección de p38/JTV-1 no unido a FBP, no suprimió la expresión de c-myc (Fig. 5c). Estos resultados demuestran que se requiere la unión de p38/JTV-1 con FBP para la ubiquinación de FBP y la supresión de la expresión de c-myc. (Fig. 5d).

10 Ejemplo 1-6

Efecto del tratamiento de TGF- β 2 sobre la expresión de p38/JTV-1

Se trataron células A549 (células de carcinoma epitelial de pulmón, proporcionadas por la ATCC) con 2 ng/ml de TGF- β 2 (R&D) y se llevó a cabo el inmunoemborronado usando los anticuerpos anti p38/JTV-1, anti-FBP y anti c-myc (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) de acuerdo con el mismo procedimiento que se usó en el Ejemplo 1-2. Como control de carga se usó tubulina.

Como resultado, aumentó el nivel de expresión de p38/JTV-1 mediante el tratamiento de TGF- β 2. También, se observó que p38/JTV-1 inducido por TGF disminuyó el nivel de FBP y c-myc (Fig. 6). En conclusión, un nuevo mecanismo TGF- β induce la expresión de p38/JTV-1, que a continuación se une a FBP y suprime de esta manera la expresión del gen c-myc que se podría revelar.

25 Ejemplo 2

Regulación del mecanismo de la apoptosis mediante la interacción de p38/JTV-1 y PDK-1

Ejemplo 2-1

30 *Actividad de la AKT fosforilada en tejidos aislados de ratón deficiente en p38/JTV-1*

Los inventores examinaron la relación entre el gen p38/JTV-1 y la ruta AKT-PI3K conocida por regular la apoptosis, con el fin de investigar el mecanismo inhibidor de la apoptosis mediante el gen p38/JTV-1. Para esto, se aislaron tejidos de corazón, hígado, tracto intestinal y cerebro de ratón de tipo natural y de ratón deficiente en p38/JTV-1. Y se extrajeron las proteínas de estos tejidos y se analizaron mediante inmunoemborronado usando el anticuerpo anti-AKT fosfoespecífico (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y el anticuerpo anti-PIK3 fosfoespecífico (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) de acuerdo con los procedimientos conocidos (Kim T y col., J. Biol. Chem., 275: 21768-21772, 2000). Se usó tubulina como control de carga. De la misma manera, en células de fibroblasto embrionario de ratón de tipo natural y deficiente en p38/JTV-1, se examinó la actividad de la AKT fosforilada (p-AKT) y PIK3. Estas células de fibroblasto embrionario de ratón deficiente en p38/JTV-1 se obtuvieron de embriones de 13,5 días de ratón deficiente en p38/JTV-1, de los cuales se cortaron a continuación los tejidos con cuchillas y tijeras y se incubaron con disolución de tripsina-EDTA a 37°C durante 1 hora. La disolución de cultivo se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 min para eliminar los sobrenadantes, y el aglomerado de tejido precipitado se incubó en medio de cultivo (RPMI-1640 que contenía FBS al 10%) a 37°C durante un día. Se recuperaron las células cultivadas lavándolas y a continuación se usaron para los experimentos.

Como resultado, en todos los tejidos aislados de ratón deficiente en p38/JTV-1, el nivel de expresión de PL3K y la AKT total no mostraron diferencia respecto de los del tipo natural mientras que el nivel de expresión de la AKT fosforilada (p-AKT) aumentó en comparación con el tipo natural (Fig. 8a). Se obtuvieron los mismos resultados del experimento usando células de fibroblasto embrionario de ratón (Fig. 8b). A partir de estos resultados, se supuso que p38/JTV-1 podría estar asociada con la actividad de fosforilación de AKT.

Ejemplo 2-2

55 *Cambio en la actividad de la AKT fosforilada de acuerdo con el aumento de la expresión de p38/JTV-1 y el intervalo de tiempo en células cancerosas*

Se transfectó la línea celular HCT116 (línea celular de carcinoma colorrectal humano) con diferentes cantidades (0,05 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml) del plásmido de expresión p38/JTV-1 del Ejemplo 1-3 y a continuación, en la línea celular transfectada, se determinaron el nivel de expresión de todos los factores asociados con la ruta AKT-PI3K, esto es, la AKT fosforilada, AKT total, PDK-1 y los miembros de la familia Bcl-2 mediante el inmunoemborronado conocido (Kim T y col., J. Biol. Chem., 275: 21768-21772, 2000). Los anticuerpos usados en este inmunoemborronado fueron los anticuerpos anti BID, anti BCL-XL y anti Bax (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.). Además, se transfectó la línea celular anterior con 1 μ g/ml del plásmido de expresión p38/JTV-1 y a continuación, se examinó un cambio en el nivel de expresión de la AKT fosforilada durante el intervalo de tiempo mediante inmunoemborronado.

Como resultado, cuando aumentó el nivel de expresión de p38/JTV-1, disminuyó el nivel de expresión de la AKT fosforilada (p-308 y p-473). Por otra parte, los miembros de la familia Bcl-2 no fueron afectados por el nivel de expresión de p38/JTV-1, y el nivel de expresión de la AKT total no mostró cambio. También, el nivel de expresión de PDK-1 mostró una tendencia a disminuir de acuerdo con el aumento del nivel de expresión intracelular de p38/JTV-1 (Fig. 9a). La actividad inhibidora de la fosforilación de AKT por p38/JTV-1 aumentó de manera dependiente del tiempo (Fig. 9b). Estos resultados apoyan que p38/JTV-1 es un nuevo regulador negativo en la activación de AKT.

Ejemplo 2-3

Análisis de la interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1

Se examinó la interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1 a través de la inmunoprecipitación. La línea celular HCT116 se transfectó con un plásmido de expresión HA-(p38/JTV-1) y a continuación se llevó a cabo la inmunoprecipitación usando los anticuerpos IgG, anti PDK-1, anti-AKT y anti-PI3K. Se analizaron los inmunoprecipitados usando inmunoemborronado con los anticuerpos anti-myc, anti PDK-1 y anti-PIK3 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU) (Kim T. y col., J. Biol. Chem., 275: 21768-21772, 2000).

Como resultado, se observó la fuerte interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1. Por otra parte, no se observó interacción entre p38/JTV-1 y PL3K.

Ejemplo 2-4

Interacción entre los fragmentos de delección de PDK-1 y p38/JTV-1

Puesto que PDK-1 tiene dos motivos funcionales, la región de la quinasa (KH) que es responsable de la activación de AKT y la región homóloga de la plecstrina (PH) que es importante para el anclaje de la membrana y la activación por IP3, los inventores examinaron la interacción entre los fragmentos de delección de PDK-1 y p38/JTV-1.

Se conocía la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica PDK-1 (Nº de acceso del Gene Bank: NM_003902) y los plásmidos que expresan cada fragmento de delección de PDK-1, esto es, los plásmidos que expresan los aminoácidos 1-556, los aminoácidos 1-449, los aminoácidos 52-341, los aminoácidos 52-556, los aminoácidos 156-556 y los aminoácidos 244-556 de PDK-1 (Fig. 11a) fueron suministrados por el Dr. Naoya Fijita del Institute of Molecular and Cellular Bioscience, Universidad de Tokio. Después que se transfectaron células de riñón embrionario humano con cada plásmido, se cultivaron las células y se obtuvieron los lisados celulares y a continuación, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-FLAG y se analizaron mediante inmunoemborronado usando el anticuerpo anti p38/JTV-1 y el anticuerpo anti-FLAG (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) (Kim T. y col., J. Biol. Chem., 275: 21768-21772, 2000).

Como resultado, en comparación con la fuerte interacción entre p38/JTV-1 y el fragmento de longitud completa de la PDK-1, la delección de la región de la quinasa suprimió la capacidad de interacción de PDK-1 y p38/JTV-1. Por el contrario, la delección de la región PH no afecta la interacción con p38/JTV-1 (Fig. 11b). Por tanto, a partir del hecho de que el fragmento PDK-1, que es deficiente en la región de la quinasa (KH) que activa AKT, no mostró interacción con p38/JTV-1, podría observarse que p38/JTV-1 se une a la región KH de PDK-1 y por tanto suprime PDK-1 de la activación de AKT.

Ejemplo 2-5

Cambio en el nivel de expresión de p38/JTV-1 de acuerdo con el tratamiento de los ligandos de muerte

Bajo la presencia de ligandos de muerte, se examinó un cambio en el nivel de expresión de p38/JTV-1. Células HCT 116 (carcinoma colorrectal humano, proporcionado por la ATCC) en las que se introdujo el plásmido de expresión p38/JTV-1 se trataron con ligandos de muerte para promover la apoptosis uniéndose a un receptor de muerte, una de las rutas de transducción de la señal para regular la apoptosis, y se examinó el nivel de expresión de p38/JTV-1. Como ligandos de muerte, se usaron 500 ng/ml de FasL o 10 ng/ml de TNF, y después de que se hubieron tratado en la línea celular anterior durante 6 horas, se examinó el nivel de expresión de p38/JTV-1, p-AKT, AKT total y PDK-1 mediante inmunoemborronado usando cada anticuerpo específico (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU). Se usó tubulina como control de carga. También, después que las células HCT 116 en las que se introdujo el plásmido de expresión p38/JTV-1 se trataron con ligandos de muerte, respectivamente, se inmunoprecipitaron los lisados celulares con el anticuerpo anti-PDK-1 y a continuación se inmunoemborraron con el anticuerpo anti p38/JTV-1.

Como resultado, cuando se trataron FasL y TNF, aumentó la expresión de p38/JTV-1 y disminuyó el nivel de expresión de p-AKT en comparación con el caso en el que no se trató con ligandos de muerte (Fig. 12a). También, aumentó la interacción entre p38/JTV-1 y PDK-1 de acuerdo con el tratamiento de los ligandos de muerte (Fig. 12b).

Ejemplo 3

Confirmación del uso de p38/JTV-1 como agente anticanceroso

5 Ejemplo 3-1

Efecto de p38/JTV-1 sobre la proliferación de líneas celulares cancerosas

Después que se hubieron transfectado las líneas celulares cancerosas con el plásmido de expresión p38/JTV-1, se cultivaron durante 48 horas y se examinó la proliferación de las células usando timidina radioactiva. Como líneas celulares cancerosas, se adquirieron células HCT116 (carcinoma colorrectal humano), HeLa (cáncer cervical) y A549 (carcinoma epitelial de pulmón) de la ATCC (American Type Culture Collection). Las células transfectadas se transfirieron sobre un medio nuevo que contenía ^{3}H timidina y se cultivaron adicionalmente durante 4 horas. Las células cultivadas se lavaron, recogieron, y a continuación se lisaron con tampón RIPA. Se cuantificó la cantidad de timidina incorporada usando el contador de centelleo en líquido, y se calculó la velocidad de síntesis de ADN a partir de la cantidad de timidina incorporada. Se calculó la velocidad relativa de síntesis de ADN en los grupos experimentales a partir de la velocidad de síntesis de ADN en el grupo control definida como 1.

Como resultado, p38/JTV-1 suprimió significativamente la proliferación de células HCT116 (carcinoma colorrectal humano), HeLa (cáncer cervical) y A549 (carcinoma epitelial de pulmón) (Fig. 14).

Ejemplo 3-2

Cambio en la apoptosis en las líneas celulares cancerosas en las que se introdujo p38/JTV-1

Después que se hubieron transfectado células HeLa (línea celular de cáncer cervical) con el plásmido de expresión p38/JTV-1 durante 24 horas, se cultivaron adicionalmente durante 24 horas después de la adición de 500 ng/ml de FasL y a continuación, se determinaron la liberación del Citocromo C y las células en las que se produjo la apoptosis. También, se trataron células HeLa con ADNpc que no contenía el gen p38/JTV-1 de la misma manera que anteriormente y a continuación se compararon con el caso en el que se introdujo el gen p38/JTV-1. La liberación del Citocromo C, un cambio fisiológico que se produce en las células que muestran apoptosis, se exporta desde la mitocondria debido a la pérdida de la diferencia de potencial de la mitocondria, y tiene la función de activar la caspasa 9 y apaf-1. Se midió el número de células en las que se producía la apoptosis mediante el colorante de exclusión tripan azul (Rao M, Kumar y col., J. Biochem. (Tokio), 125(2): 383-90, 1999), y se detectó la liberación del Citocromo C en la mitocondria mediante el inmunoemborronado del Citocromo C en el interior del citoplasma tras la eliminación de las fracciones de microorganelas. En otras palabras, se cultivaron las células He-La con la disolución de almacenamiento (disolución hipotónica NaCl 10 ml, $MgCl_2$ 1,5 mM, Tris-Cl, pH 7,5) y se rompieron las membranas plasmáticas usando un homogeneizador dounce de vidrio bajo tampón MS (manitol 525 mM, azúcar 175 mM, Tris-Cl 175 mM, EDTA 2,5 mM, pH 7,5). Se centrifugaron las células a las que se les habían retirado las membranas plasmáticas a 1.300 rpm a 4°C durante 5 min para eliminar de esta manera el núcleo. A continuación se ultracentrifugaron a 17.000 rpm a 4°C durante 15 min para separarlas en citoplasmas y microorganelas y a continuación, se eliminaron las últimas. La fracción restante se sometió a electroforesis en SDS-PAGE y se inmunoemborrónó de acuerdo a los procedimientos conocidos para determinar de esta manera el grado de liberación del Citocromo C (Marsden V. S. y col., Nature 419: 634, 2002). Como control de carga, se usó tubulina.

Como resultado, cuando se introdujo el gen p38/JTV-1 en la línea celular cancerosa, aumentó la liberación del Citocromo C y la apoptosis en comparación con el caso en el que no se introdujo el gen p38/JTV-1. También, aumentó la apoptosis mediante el tratamiento del ligando de muerte, TNF (Fig. 15a y Fig. 15b). Esto demuestra que se puede usar p38/JTV-1 como un agente anticanceroso promoviendo la apoptosis.

Aplicabilidad industrial

Tal como se ha descrito en lo anterior, la p38/JTV-1 de la invención se puede usar con utilidad para tratar el cáncer a través del mecanismo de supresión de la proliferación de células cancerosas uniéndose a FBP (proteína de unión con FUSE) y promoviendo por tanto la ubiquinación de FBP para infraregular el gen c-myc, que es un protooncogen, y el mecanismo de promover la apoptosis de las células uniéndose a PDK-1 (proteína dependiente de fosfoinositido) e inhibiendo por tanto la fosforilación de AKT (serina/treonina quinasa). También, se puede usar p38/JTV-1 como diana para la selección de nuevos agentes anticancerosos, en virtud de dichos mecanismos de regulación de p38/JTV-1.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína p38/JTV-1 aislada para uso como medicamento.

2. La proteína p38/JTV-1 de la reivindicación 1 para el uso como medicamento para tratar el cáncer.

3. La proteína p38/JTV-1 de la reivindicación 2 **caracterizada** porque dicho cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de sangre, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, sarcoma uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer de colon, carcinoma de la trompa de Falopio, carcinoma endometrial, cáncer cervical, cáncer vulvar, carcinoma vaginal, enfermedad de Hodgkin, cáncer esofágico, cáncer de intestino delgado, cáncer endocrino, cáncer de tiroides, cáncer paratiroideo, cáncer adrenal, tumor del tejido blando, cáncer uretral, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma pélvico renal, tumor del SNC, linfoma del SNC primario, tumor de la médula ósea, gliomas de los nervios del pedúnculo cerebral, adenoma de la pituitaria, o una combinación de los mismos.

4. La proteína p38/JTV-1 de la reivindicación 1 **caracterizada** porque ésta comprende los aminoácidos seleccionados entre el grupo constituido por

(a) aminoácidos representados por la SEC DE ID N°4;

(b) aminoácidos del 84 a 161 de la SEC DE ID N°4;

(c) aminoácidos representados por la SEC. DE ID N°5; y

(d) aminoácidos representados por la SEC DE ID N°6.

5. Uso de una proteína p38/JTV-1 aislada de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

6. Uso de un ácido nucleico aislado que codifica la proteína p38/JTV-1 de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

7. El uso de la reivindicación 6 **caracterizado** porque el ácido nucleico aislado comprende un nucleótido seleccionado entre el grupo constituido por:

(a) secuencia de nucleótidos representada por la SEC DE ID N°1;

(b) secuencia de nucleótidos del 250 al 483 en la SEC DE ID N°1;

(c) secuencia de nucleótidos representada por la SEC DE ID N°2; y

(d) secuencia de nucleótidos representada por la SEC DE ID N°3.

8. Un procedimiento para seleccionar una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer **caracterizado** porque comprende las etapas de:

(a) cultivar la proteína p38/JTV-1 o una célula recombinante que expresa dicha proteína con una sustancia candidata; y

(b) determinar el efecto de la sustancia candidata sobre el aumento de la actividad de la proteína p38/JTV-1 o el nivel intracelular de la misma.

FIG. 1

B42-

- P38/JTV-1 KRS WRS YRS QRS FBP -

LexA-p38/JTV-1



FIG. 2

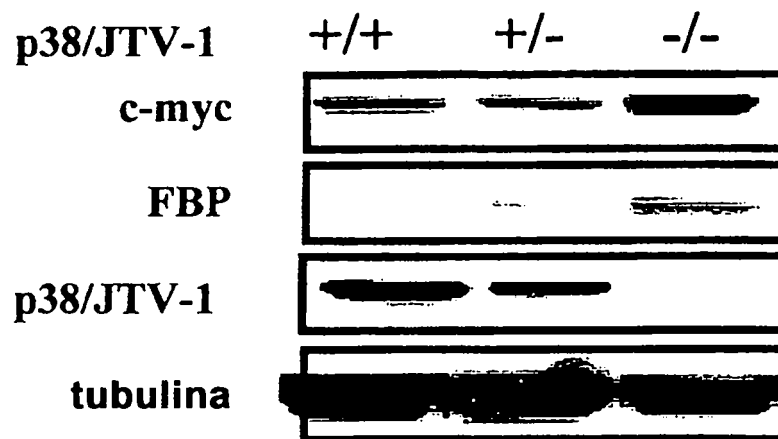


FIG. 3

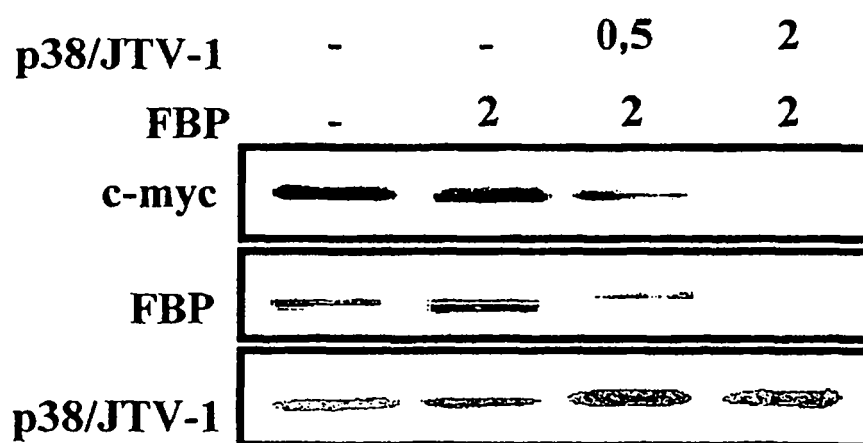


FIG. 4A

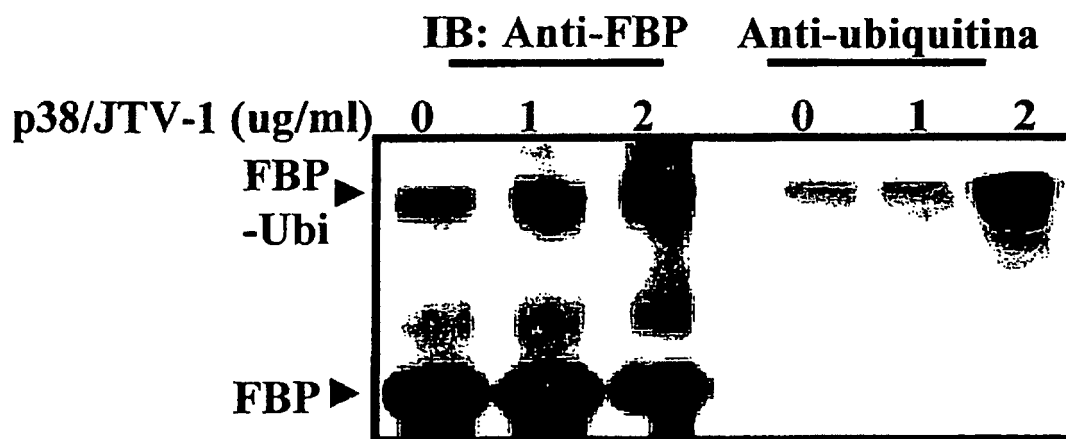


FIG. 4B

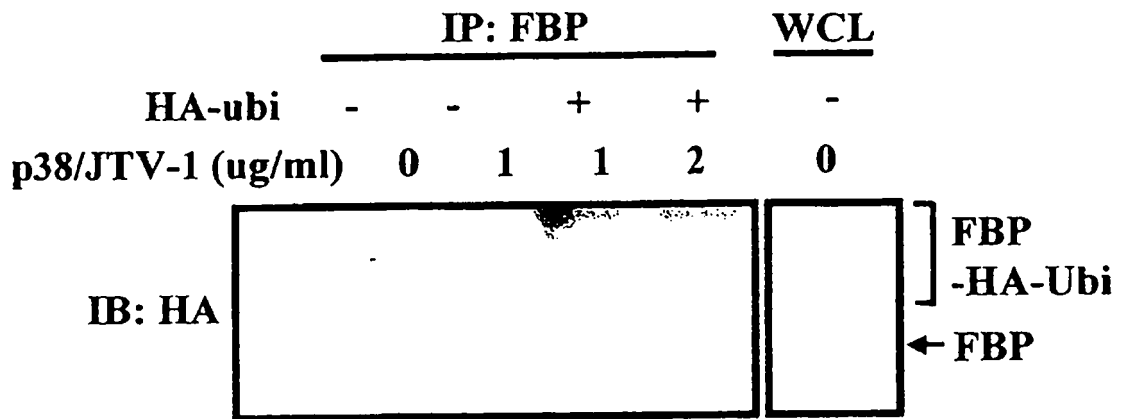


FIG. 5A

Delección de p38/JTV-1

completo 1-161 84-320 162-320 -

IP: c-myc



WB: FBP

WCL

WB: c-myc

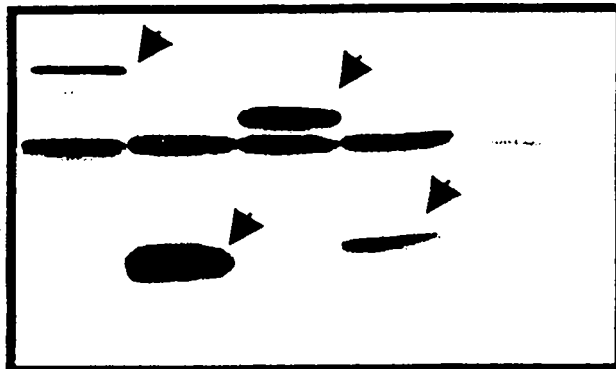


FIG. 5B

Delección de p38/JTV-1

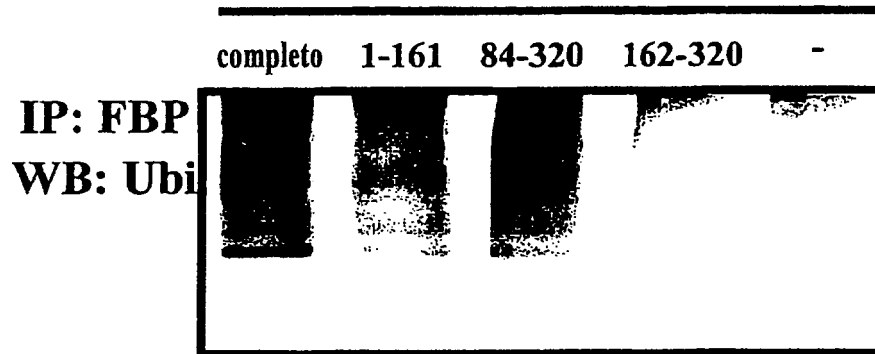


FIG. 5C

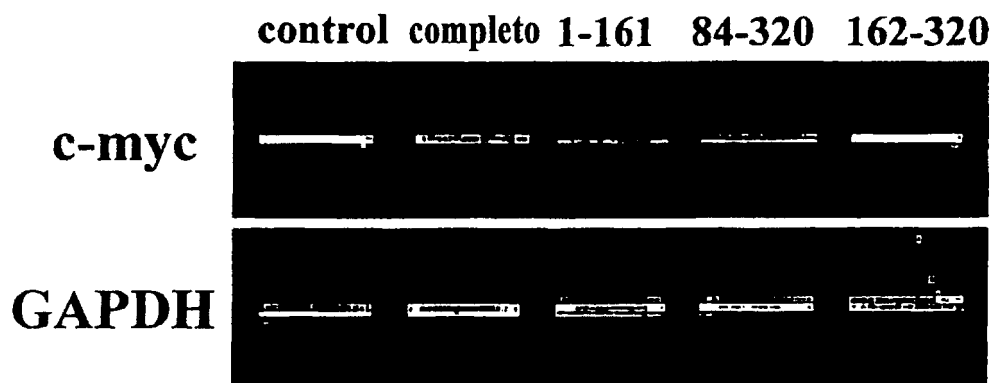


FIG. 5D





<u>Delección de p38/JTV-1</u>	<u>FBP de unión</u>	<u>FBP Ubi</u>	<u>c-myc Control</u>
1 161 	+	+	+
84 320 	+	+	+
162 320 	-	-	-
1 320 	+	+	+

FIG. 6

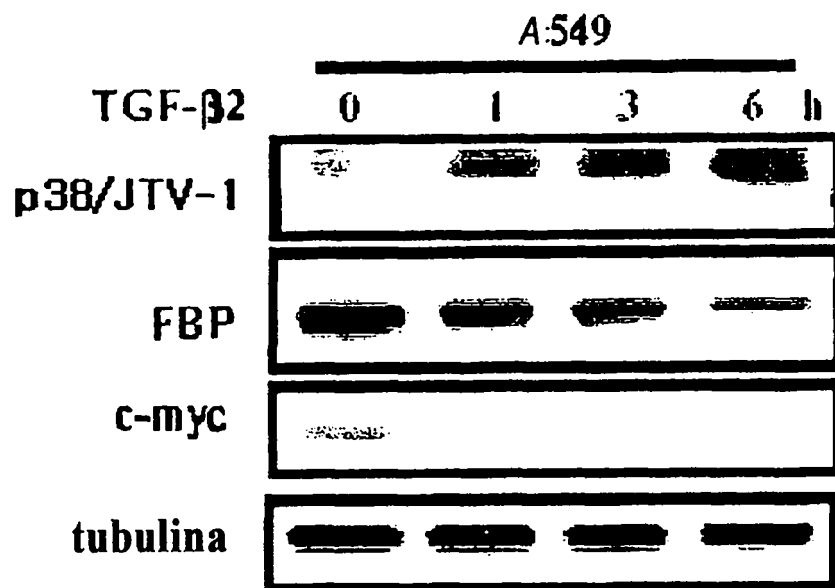


FIG. 7

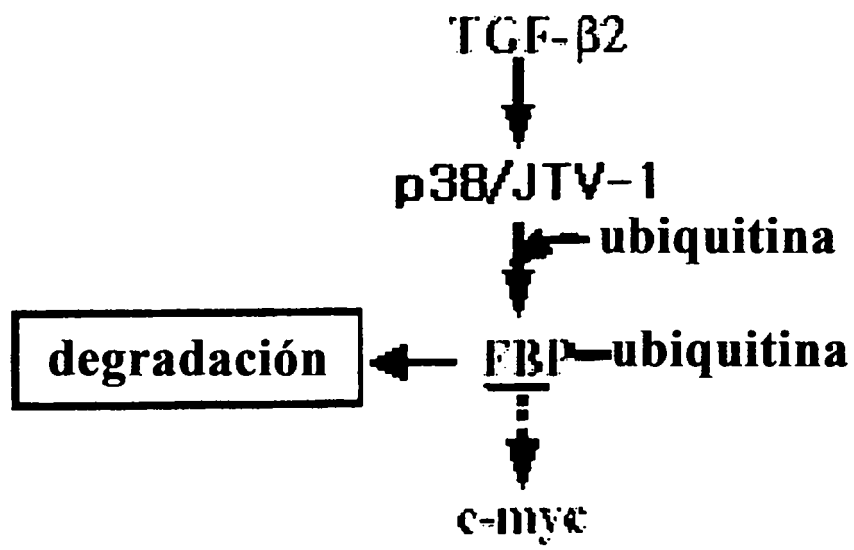


FIG. 8A

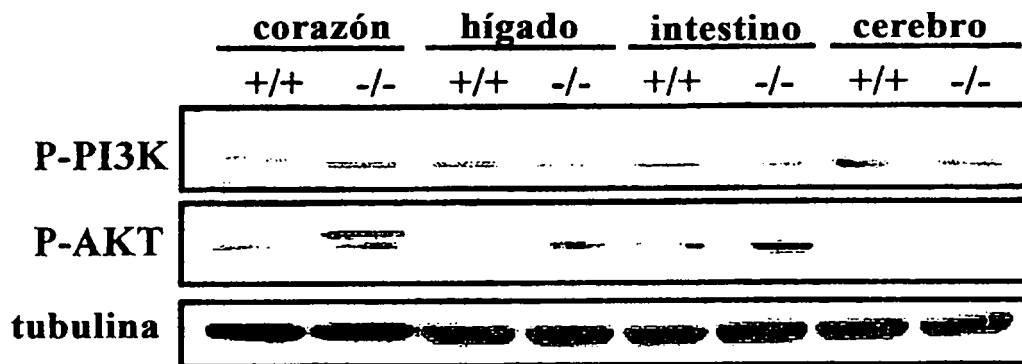


FIG. 8B

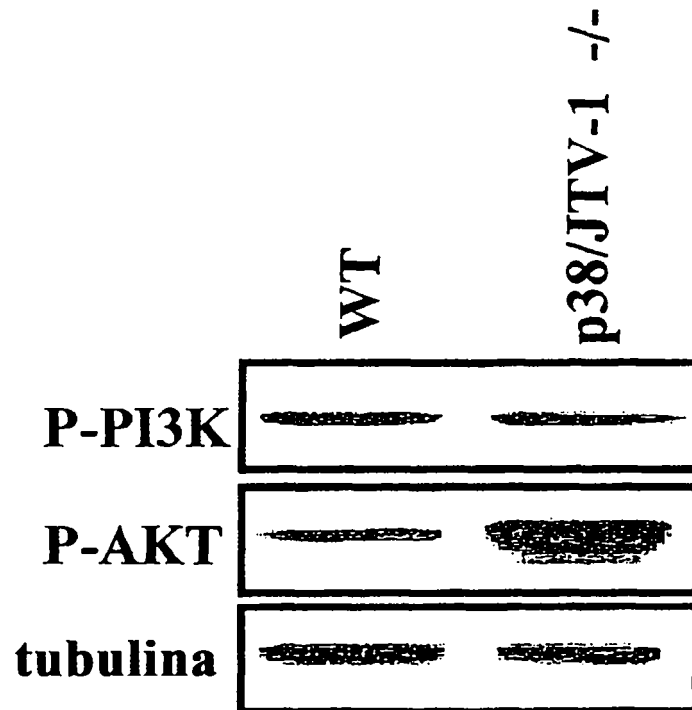


FIG. 9A

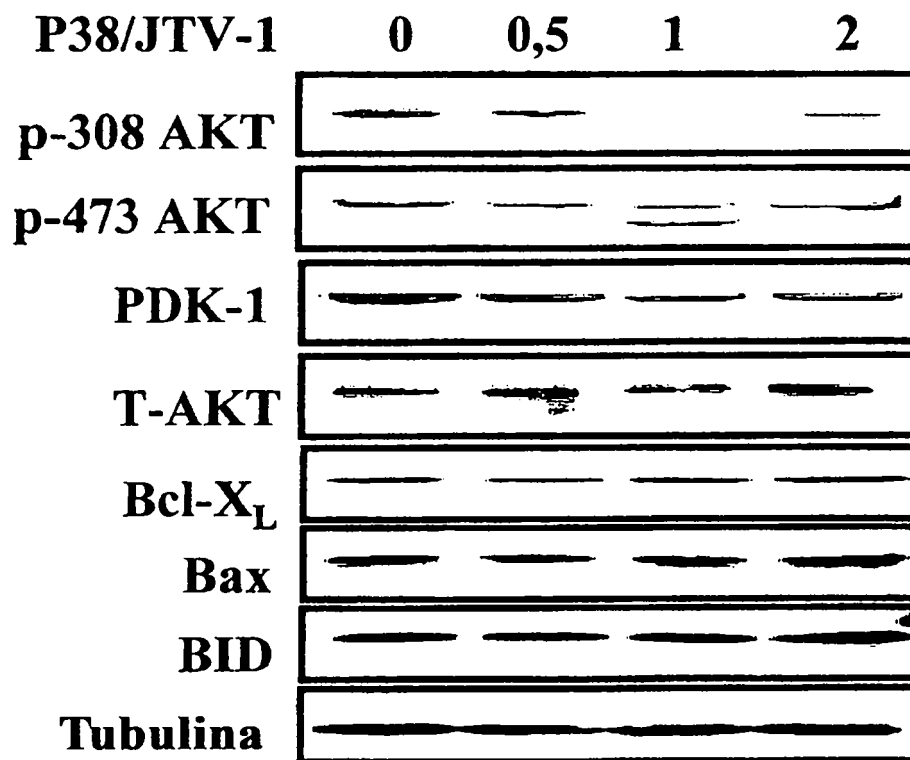


FIG. 9B

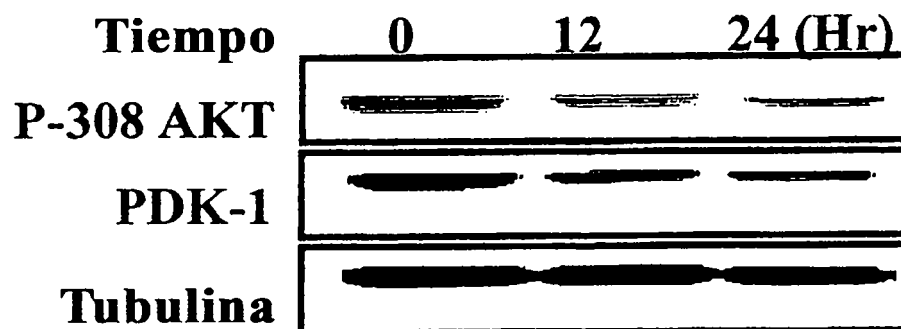


FIG. 10

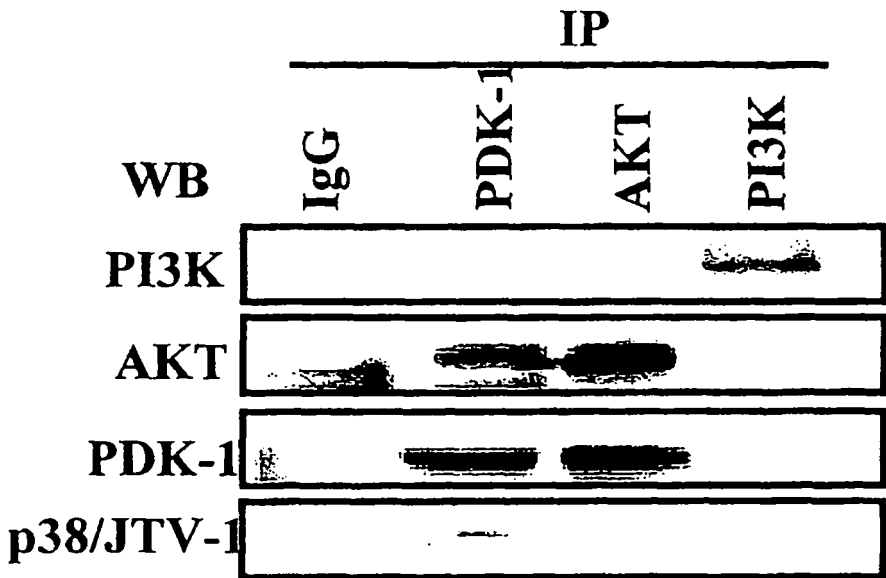


FIG. 11A

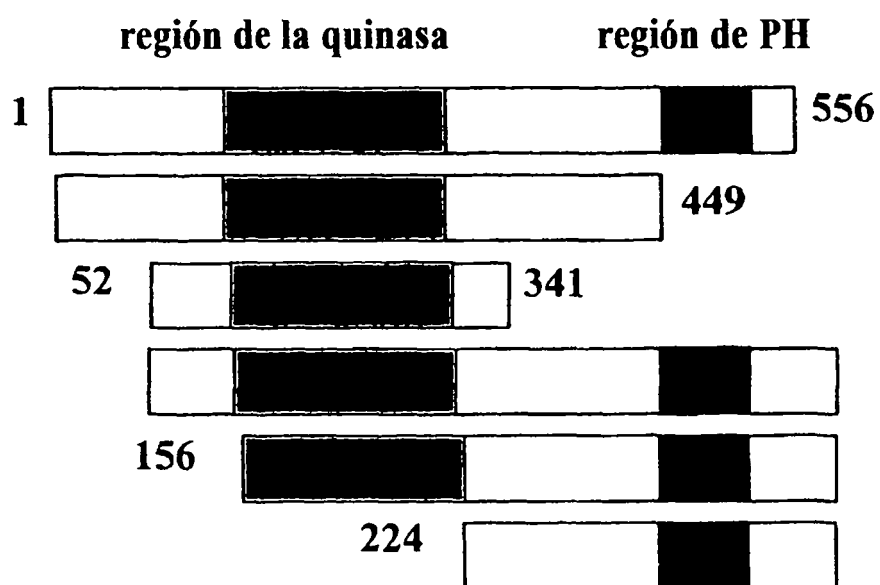


FIG. 11B

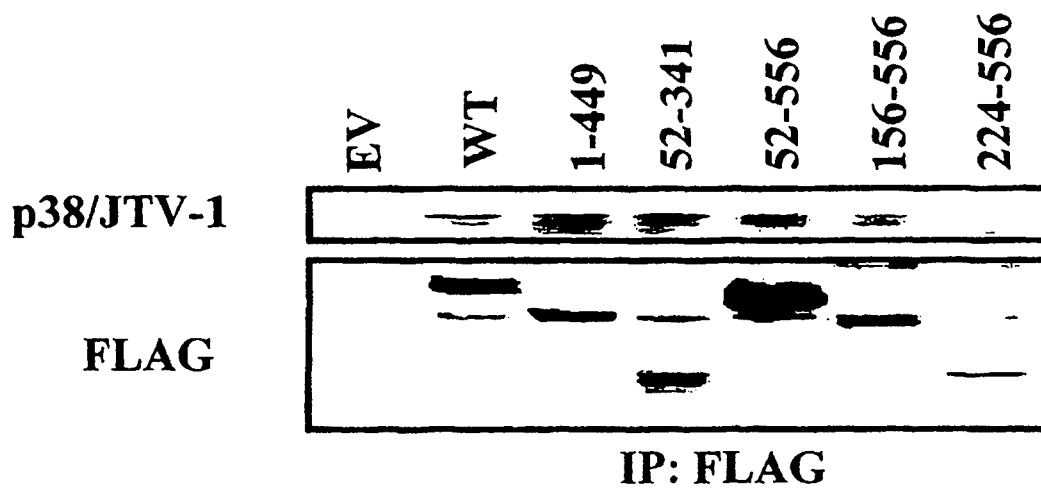


FIG. 12A

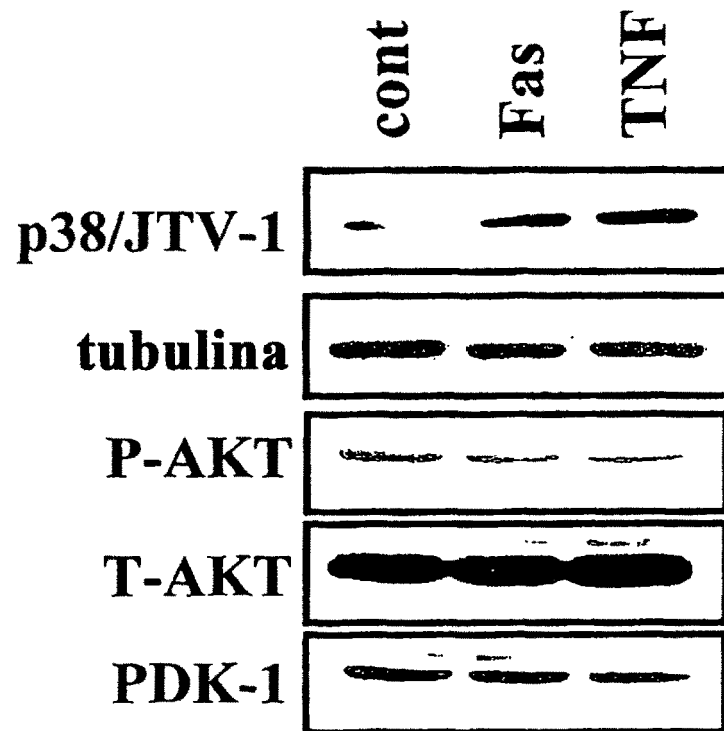


FIG. 12B

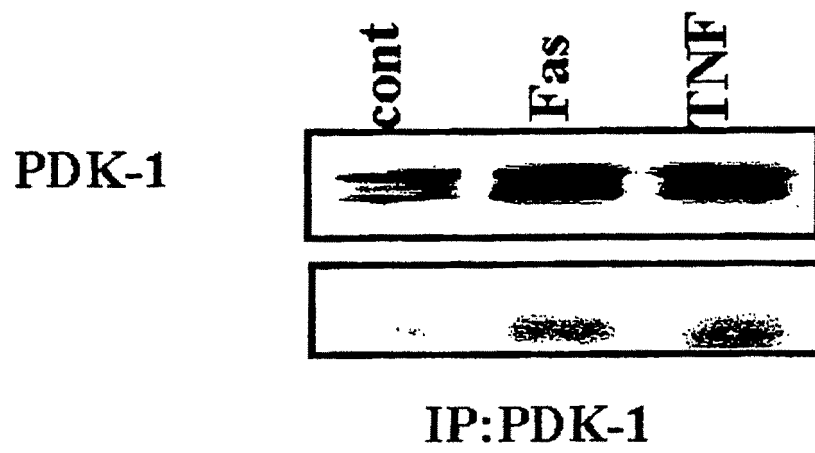


FIG. 13

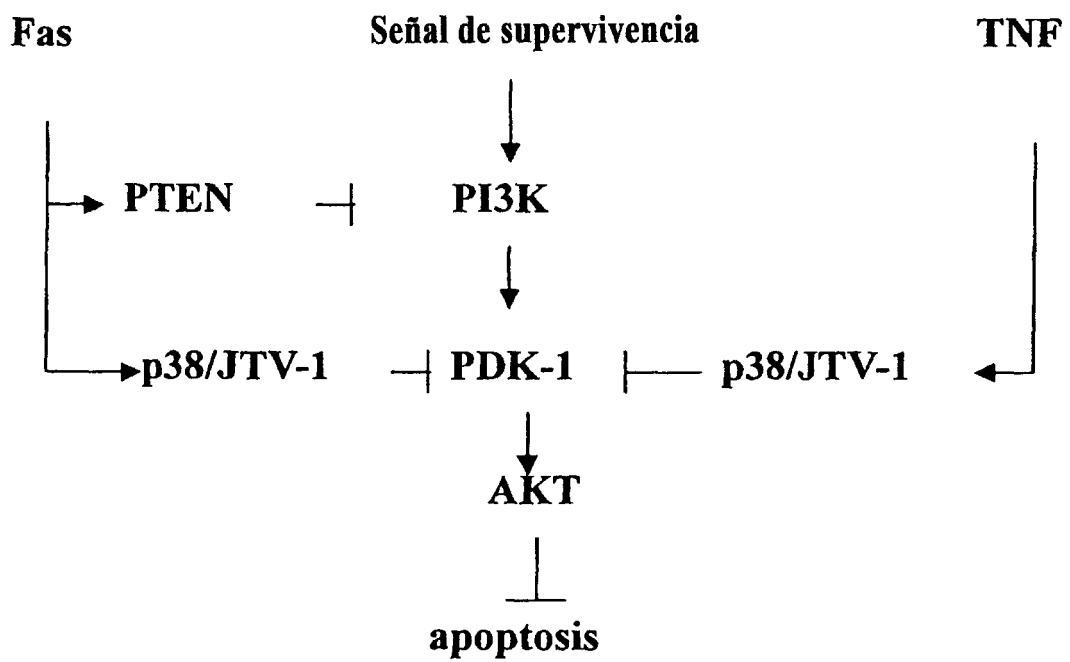


FIG. 14

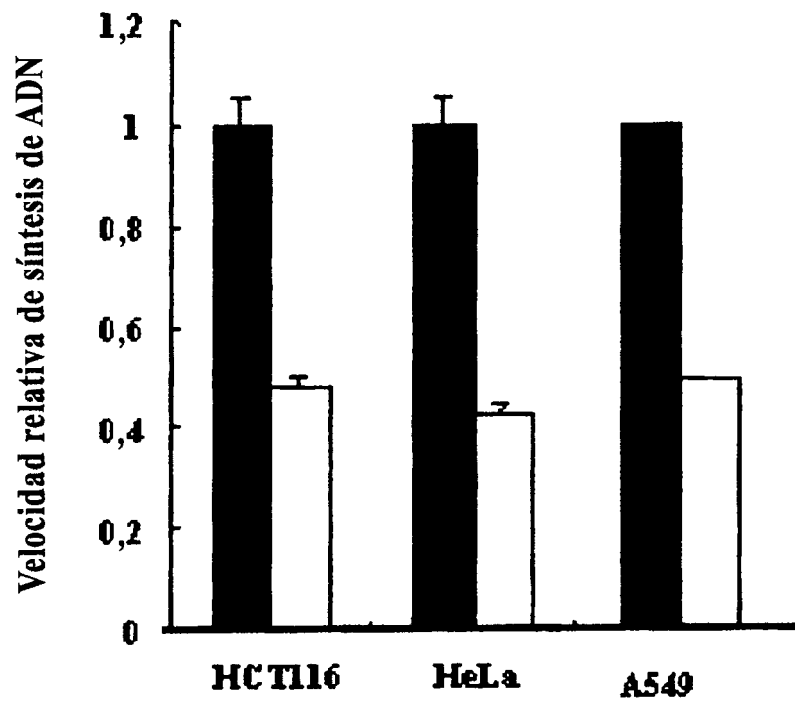


FIG. 15A

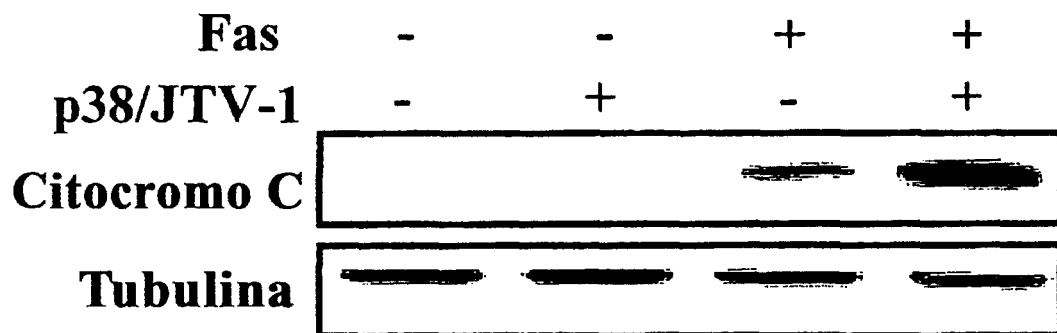
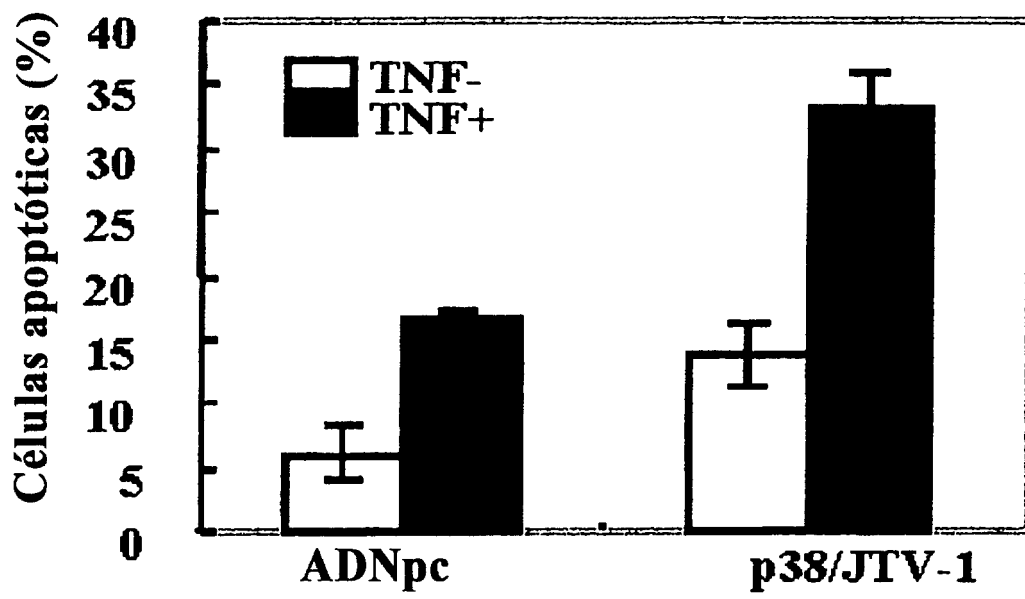


FIG. 15B



ES 2 323 580 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Seoul National University Industry Foundation
 5 <120> Uso novedoso de p38/JT1/-1
 <160> 17
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 10 <211> 936
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 15 <221> gen
 <222> (1)..(936)
 <223> gen que codifica la secuencia de aminoácidos 1-312 de p38/JTV-1
 20 <400> 1

```

atgccgatgt accaggtaaa gccctatcac gggggcggcg cgcctcicc tgggagctt    60
cccactgca tglaccggct cccaacgtg cacggcagga gctacggccc agcggcgggc    120
gctggccacg tgcaggaaga gctaacctg tcttgcaag ctctgagtc ccgccaagat    180
gatatttaa aacgtctgta tgagtgaaa gctgcagltg atggcctcic caagatgatt    240
caaacaccag atgcagactt ggalgtaacc aacataatcc aagcggatga gccacgact    300
ttaaccacca atgcgctgga ctgaaatca gtgcttggga aggattacgg ggcgctgaaa    360
gacatcgtga tcaacgcaa cccggcctcc cctcccctct ccctgctgt gctgcacagg    420
ctgctctgtg agcacttcag ggtcctgtcc acggtgcaca cgcactcctc ggtcaagagc    480
gtgcctgaaa accttctcaa gtccttggga gaacagaata aaaaacagcc ccgccaagac    540
tatcagctgg gattcacttt aattggaag aatgtgccga agacgcagat gaaattcagc    600
atccagacga tgtgcccac cgaaggcgaa gggaacattg cacgtttctt gttctctctg    660
tttgccaga agcalaatgc tglcaacgca acccttatag atagctgggt agatattgcy    720
atitticagt taaaagaggg aagcagtaaa gaaaaagccg ctgtttccg ctccatgaac    780
ctgtctcttg ggaagagccc ttgctcgtct gggaatgaac tcaccgtagc agacgtggtg    840
ctgtgtcttg tactccagca gatcggaggc tgcagtgtga cagtgccagc caatgtgcag    900
agglggatga ggtctgtga aaacctggct cctttt                                936
  
```

40 <210> 2
 <211> 483
 <212> ADN
 45 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(483)
 50 <223> gen que codifica la secuencia de aminoácidos 1-161 de p38/JTV-1
 <400> 2

```

atgccgatgt accaggtaaa gccctatcac gggggcggcg cgcctcicc tgggagctt    60

cccactgca tglaccggct cccaacgtg cacggcagga gctacggccc agcggcgggc    120
gctggccacg tgcaggaaga gctaacctg tcttgcaag ctctgagtc ccgccaagat    180
gatatttaa aacgtctgta tgagtgaaa gctgcagltg atggcctcic caagatgatt    240
caaacaccag atgcagactt ggalgtaacc aacataatcc aagcggatga gccacgact    300
ttaaccacca atgcgctgga ctgaaatca gtgcttggga aggattacgg ggcgctgaaa    360
gacatcgtga tcaacgcaa cccggcctcc cctcccctct ccctgctgt gctgcacagg    420
ctgctctgtg agcacttcag ggtcctgtcc acggtgcaca cgcactcctc ggtcaagagc    480
gtg                                                483
  
```


ES 2 323 580 T3

<400> 4

5 Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu
 1 5 10 15
 Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly
 20 25 30
 Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Glu Glu Ser
 35 40 45
 10 Asn Leu Ser Leu Gln Ala Leu Glu Ser Arg Gln Asp Asp Ile Leu Lys
 50 55 60
 Arg Leu Tyr Glu Leu Lys Ala Ala Val Asp Gly Leu Ser Lys Met Ile
 65 70 75 80

15

Gln Thr Pro Asp Ala Asp Leu Asp Val Thr Asn Ile Ile Gln Ala Asp
 85 90 95
 20 Glu Pro Thr Thr Leu Thr Thr Asn Ala Leu Asp Leu Asn Ser Val Leu
 100 105 110
 Gly Lys Asp Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro
 115 120 125
 25 Ala Ser Pro Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu
 130 135 140
 His Phe Arg Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Glu Asn Leu Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln
 165 170 175
 30 Pro Arg Gln Asp Tyr Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val
 180 185 190
 Pro Lys Thr Gln Met Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu
 195 200 205
 35 Gly Glu Gly Asn Ile Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys
 210 215 220
 His Asn Ala Val Asn Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala
 225 230 235 240
 40 Ile Phe Gln Leu Lys Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe
 245 250 255
 Arg Ser Met Asn Ser Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn
 260 265 270
 45 Glu Leu Thr Val Ala Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile
 275 280 285
 Gly Gly Cys Ser Val Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg
 290 295 300
 Ser Cys Glu Asn Leu Ala Pro Phe
 305 310

50

<210> 5

<211> 161

55

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

60

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(161)

<223> secuencia de aminoácidos 1-161 de p38/JTV-1

65

ES 2 323 580 T3

<400> 5

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

20

25 Gly Lys Asp Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro
115 120 125
Ala Ser Pro Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu
130 135 140
His Phe Arg Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser
145 150 155 160
30 Val

<210> 6

<211> 229

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> PÉPTIDO

40 <222> (1)..(229)

<223> secuencia de aminoácidos 84-312 de p38/JTV-1

45

50

55

60

65

ES 2 323 580 T3

<400> 6

5 Asp Ala Asp Leu Asp Val Thr Asn Ile Ile Gln Ala Asp Glu Pro Thr
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Thr Asn Ala Leu Asp Leu Asn Ser Val Leu Gly Lys Asp
 20 25 30
 Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro
 35 40 45
 10 Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg
 50 55 60
 Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu
 65 70 75 80
 15 Asn Leu Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln
 85 90 95
 Asp Tyr Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr
 100 105 110
 20 Gln Met Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly
 115 120 125
 Asn Ile Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala
 130 135 140
 Val Asn Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln
 145 150 155 160
 25 Leu Lys Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met
 165 170 175
 Asn Ser Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr
 180 185 190
 30 Val Ala Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys
 195 200 205
 Ser Val Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu
 210 215 220
 35 Asn Leu Ala Pro Phe
 225

<210> 7

>211> 30

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Cebador de sentido directo de p38/JTV-1

<400> 7

50 ccggaattca tgccgatgta ccaggtaaag

30

<210> 8

<211> 30

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Cebador de sentido contrario de p38/JTV-1

<400> 8

65 ccgctcgagt taaaaaggag ccaggttttc

30

<210> 9

<211> 21

ES 2 323 580 T3

	<code><212> ADN</code>	
	<code><213> Secuencia artificial</code>	
	<code><220></code>	
5	<code><223> Cebador de sentido directo de p38/JTV-1</code>	
	<code><400> 9</code>	
10	<code>atgccgatgt accaggtaaa g</code>	21
	<code><210> 10</code>	
	<code><211> 20</code>	
15	<code><212> ADN</code>	
	<code><213> Secuencia artificial</code>	
	<code><220></code>	
20	<code><223> Cebador de sentido contrario de p38/JT1/-1</code>	
	<code><400> 10</code>	
25	<code>aaaaggagcc aggttttcac</code>	20
	<code><210> 11</code>	
	<code>>211> 21</code>	
	<code><212> ADN</code>	
30	<code><213> Secuencia artificial</code>	
	<code><220></code>	
	<code><223> Cebador de sentido contrario de p38/JTV-1</code>	
35	<code><400> 11</code>	
	<code>cacgctcttg accgaggagt g</code>	21
40	<code><210> 12</code>	
	<code><211> 20</code>	
	<code><212> ADN</code>	
45	<code><213> Secuencia artificial</code>	
	<code><220></code>	
	<code><223> Cebador de sentido directo de p38/JTV-1</code>	
50	<code><400> 12</code>	
	<code>aaaccttctc aagtgccttg</code>	20
55	<code><210> 13</code>	
	<code><211> 21</code>	
	<code><212> ADN</code>	
	<code><213> Secuencia artificial</code>	
60	<code><220></code>	
	<code><223> Cebador de sentido directo de p38/JTV-1</code>	
65	<code><400> 13</code>	
	<code>agatgcagac ttggatgtaa c</code>	21

ES 2 323 580 T3

	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de sentido directo de c-myc	
10	<400> 14	
	cagcagcctc ccgcgacgat	20
15	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de sentido contrario de c-myc	
25	<400> 15	
	agcctggtag gagccagct	20
30	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de sentido directo de GADPH	
40	<400> 16	
	ttccatggca ccgtcaaggc	20
45	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de sentido contrario de GAPDH	
55	<400> 17	
	cttggcagcg ccagtagagg	20
60		
65		