

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 957**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 31/7105** (2006.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/JP2016/062090**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16167340**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16780131 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024 EP 3284481**

54 Título: **Agente inductor de muerte celular para células que tienen mutación en el gen BRAF, agente para inhibir la proliferación de dichas células y composición farmacéutica para tratar a un paciente que padece efectos de proliferación anómala de dichas células**

30 Prioridad:

**16.04.2015 JP 2015084286**  
**11.04.2016 JP 2016078710**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NIITSU, YOSHIRO y**  
**NISHITA, HIROKI**

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 957 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

5 Agente inductor de muerte celular para células que tienen mutación en el gen BRAF, agente para inhibir la proliferación de dichas células y composición farmacéutica para tratar a un paciente que padece efectos de proliferación anómala de dichas células

**Campo técnico**

10 La presente invención se refiere a un agente inductor de muerte celular para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF (por ejemplo, un tipo de célula cancerosa), a un agente supresor del crecimiento para la misma célula y a una composición farmacéutica para la terapia de una enfermedad provocada por un defecto de crecimiento de la misma célula, tal como se define en las reivindicaciones.

**Antecedentes de la técnica**

15 El gen BRAF es un gen que codifica para un tipo de serina treonina cinasa que constituye la ruta RAS-RAF-MAPK. Se han notificado mutaciones en el gen BRAF en diversos tumores. Por ejemplo, la mutación en la que la valina en el aminoácido 600 se sustituye por ácido glutámico (V600E) se encuentra en muchas células cancerosas. Se sabe que BRAF que tiene la mutación V600E siempre activa la señalización aguas abajo y provoca un crecimiento celular sin estimulación extracelular.

20 Por ejemplo, el gen BRAF que tiene la mutación V600E se encuentran en muchos cánceres colorrectales (del 5 al 15 %) y melanomas (aproximadamente el 60 %). Obsérvese que, en muchos cánceres tales como el cáncer pancreático y el cáncer colorrectal, se encuentran con alta frecuencia mutaciones en un gen KRAS. La proteína KRAS es una proteína G presente localmente en la superficie interna de la membrana celular. RAS tal como KRAS activa RAF tal como CRAF y BRAF, RAF activa secuencialmente MEK y MEK activa MAPK, formando de ese modo una cascada (documentos no de patente 1 y 2). Es un caso raro contener tanto la mutación en BRAF como la mutación en KRAS ya que la mutación en BRAF y la mutación en KRAS se encuentran en una relación mutuamente exclusiva (documento no de patente 3).

25 Actualmente, para los cánceres con BRAF que tiene la mutación V600E, se considera eficaz una terapia mediante un inhibidor contra BRAF que tiene la mutación V600E. Como inhibidor de este tipo se conocen vemurafenib (PLX4032) y PLX4720. Sin embargo, las células cancerosas pueden requerir resistencia a estos inhibidores mediante la administración continua de los mismos, lo cual limita los efectos de la terapia. Por tanto, para las células cancerosas que tienen una mutación en el gen BRAF, se requieren agentes inductores de muerte celular y agentes supresores del crecimiento más eficaces que reemplacen a estos inhibidores.

30 La glutatión-S-transferasa (GST), una de las enzimas que cataliza la conjugación de glutatión, se conoce como una enzima que conjuga una sustancia tal como un fármaco con el glutatión (GSH) en una sustancia acuosa. Basándose en la secuencia de aminoácidos, GST se clasifica de manera representativa en 6 tipos de la isozima,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\omega$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  y  $\zeta$ . De éstas, la expresión de GST- $\pi$  (glutatión S-transferasa pi, también denominada GSTP1) ha ido aumentando particularmente en diversas células cancerosas y se indica que ha sido un posible factor de la resistencia a algunos agentes antineoplásicos. De hecho, se sabe que cuando se permite que un ADN antisentido o un inhibidor de GST- $\pi$  contra GST- $\pi$  actúe sobre un sistema de células cancerosas resistentes a fármacos que sobreexpresa GST- $\pi$ , se suprime la resistencia a fármacos (documentos no de patente 4 a 6). Además, en un informe reciente, cuando se permite que un ARNip contra GST- $\pi$  actúe sobre una línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos que sobreexpresa GST- $\pi$ , se suprime el crecimiento de la misma y se aumenta la apoptosis (documento no de patente 7).

35 Adicionalmente, se sabe que GST- $\pi$  forma un complejo con cinasa c-Jun N-terminal (JNK) e inhibe la actividad JNK (documento no de patente 8). Además, se sabe que GST- $\pi$  está implicada en la S-glutatonilación de proteínas que se asocian con las respuestas al estrés celular (documento no de patente 9). Además, se sabe que GST- $\pi$  contribuye a la acción protectora en la muerte celular inducida por especies reactivas del oxígeno (ROS) (documento no de patente 10). Tal como se describió anteriormente, se entiende que GST- $\pi$  entre las GST tiene diversas características y funciones.

40 Se notifica que cuando se permite que un ARNip contra GST- $\pi$  actúe sobre un sistema de células cancerosas que tienen una mutación en KRAS, se suprime la activación de Akt y aumenta la autofagia, pero la inducción de apoptosis es aproximadamente moderada (documento no de patente 11). El documento de patente 1 divulga que puede inducirse la apoptosis de células cancerosas usando un fármaco que suprime GST- $\pi$  y un inhibidor de la autofagia tal como 3-metiladenina como componentes activos. El documento de patente 2 divulga además que, cuando se inhibe simultáneamente la expresión de GST- $\pi$  y Akt, se suprime el crecimiento celular y se induce la muerte celular y se suprime notablemente la autofagia inducida por la inhibición de la expresión de GST- $\pi$  inhibiendo simultáneamente la expresión de Akt y similares.

65

Sin embargo, en la célula que tiene una mutación en el gen BRAF descrita anteriormente, no hay ningún hallazgo en la relación entre la expresión de GST- $\pi$  y el crecimiento celular o la muerte celular o el papel de GST- $\pi$  en la transducción de señales.

## 5 Lista de referencias

### Bibliografía de patentes

Documento de patente 1: documento WO2012/176282

10

Documento de patente 2: documento WO2014/098210

### Bibliografía no de patentes

15 Documento no de patente 1: Curr Top Microbiol Immunol. 2012; 355: 83-98

Documento no de patente 2: Curr Opin Pharmacol. Agosto de 2008; 8(4): 419-26.

Documento no de patente 3: British Journal of Cancer (2013) 108, 1757-1764.

20

Documento no de patente 4: Takahashi y Niitsu, Gan To Kagaku Ryoho. 1994; 21(7): 945-51

Documento no de patente 5: Ban *et al.*, Cancer Res. 1996; 56(15): 3577-82

25 Documento no de patente 6: Nakajima *et al.*, J Pharmacol Exp Ther. 2003; 306(3): 861-9

Documento no de patente 7: Hokaiwado *et al.*, Carcinogenesis. 2008; 29(6): 1134-8

Documento no de patente 8: Adler *et al.*, EMBO J. 1999, 18, 1321-1334

30

Documento no de patente 9: Townsend *et al.*, J. Biol. Chem. 2009, 284, 436-445

Documento no de patente 10: Yin *et al.*, Cancer Res. 2000 60, 4053-4057

35 Documento no de patente 11: Nishita *et al.*, 102ª reunión anual de la AACR, resumen n.º 1065

Yan-Jie Zhang *et al.* analizan que la señalización de mTOR está implicada en la supresión por indometacina y nimesulida del crecimiento de células de cáncer colorrectal a través de la ruta independiente de COX-2, publicado en Annals of Surgical Oncology, Springer-Verlag, NE, vol. 18, n.º 2, 28 de agosto de 2010 (28-08-2010), páginas 580-588, XP019879260, ISSN: 1534-4681, DOI: 10.1245/S10434-010-1268-9.

40

Mertens W.C. *et al.* analizan indometacina y ranitidina orales en melanoma avanzado, publicado en Clinical Onco, W.B. Saunders, Ámsterdam, Países Bajos, vol. 8, n.º 2, 1 de enero de 1996 (01-01-1996), páginas 112-115, XP004929659, ISSN: 0936-6555, DOI: 10.1016/50936-6555(96)80117-8.

45

Luca, A.D. *et al.* analizan un nuevo inhibidor soluble en agua activo por vía oral de glutatión-transferasa humana que ejerce una actividad antitumoral potente y selectiva contra xenoinjertos de melanoma humano, publicado en Oncotarget, vol. 6, n.º 6, de febrero de 2015 (06-02-2015), páginas 4126-4143, XP055321169.

50

Turley, C.K. *et al.* analizan que la supresión de GSTP1 induce la apoptosis en células de melanoma independientemente del estado mutacional en BRAF, publicado en Journal of Surgical Research, vol. 172, n.º 2, 1 de enero de 2012 (01-01-2012), página 229, XP055491483, DOI: 10.1016/J.JSS.2011.11.346.

55

El documento WO 2012/176282 A1 (NITTO DENKO CORP.), presentado el 27 de diciembre de 2012, se refiere a composiciones y a métodos para modular la expresión de *apoa1* y *abca1*.

El documento WO 2014/098210 A1 (NITTO DENKO CORP.), presentado el 26 de junio de 2014, se refiere a un agente inductor de apoptosis.

60

Tsai, J. *et al.* analizan el descubrimiento de un inhibidor selectivo de cinasa B-raf oncogénica con una actividad antimelanoma potente, publicado en PNAS, vol. 105, n.º 8, 2008, páginas 3041-3046, XP055003766.

### Sumario

65 La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para la terapia de un cáncer provocado por un defecto de crecimiento de una célula cancerosa que tiene

una mutación en un gen BRAF y resistencia a un inhibidor de BRAF,

comprendiendo la composición farmacéutica un agente inductor de muerte celular o agente supresor del crecimiento celular para una célula que tiene una mutación en un gen BRAF, comprendiendo dicho agente un fármaco que suprime GST- $\pi$  como principio activo,

en la que el fármaco es una sustancia seleccionada del grupo que consiste en moléculas de iARN, ribozimas, ácidos nucleicos antisentido, polinucleótidos quiméricos de ADN/ARN y vectores que expresan al menos uno de los mismos.

En las reivindicaciones también se definen aspectos adicionales de la invención.

#### **Problema técnico**

Es estas circunstancias, la presente invención tiene como objeto proporcionar un agente que tiene una acción inductora de muerte celular y/o una acción supresora del crecimiento celular para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF, proporcionar una composición farmacéutica para la terapia de una enfermedad provocada por un defecto de crecimiento celular y proporcionar un método para seleccionar el agente inductor de muerte celular y/o el agente supresor del crecimiento celular.

Las composiciones farmacéuticas y los agentes comprendidos en las mismas se definen en las reivindicaciones.

#### **Solución al problema**

Los presentes inventores llevaron a cabo extensos estudios en vista del objeto anterior y hallaron que se suprime intensamente el crecimiento celular cuando se suprime GST- $\pi$  en una célula que tiene una mutación en el gen BRAF y también se suprime intensamente el crecimiento celular cuando se suprime GST- $\pi$  incluso en una célula que tiene la mutación en el gen BRAF y es resistente a los inhibidores de BRAF convencionalmente conocidos, mediante lo cual se logró la presente invención. La presente invención incluye lo siguiente.

#### **Efectos ventajosos de la invención**

El agente inductor de muerte celular de la invención y las composiciones que comprenden el mismo se definen en las reivindicaciones.

Según el agente inductor de muerte celular de la presente invención, puede inducirse la muerte celular muy intensamente para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF. Por consiguiente, el agente inductor de muerte celular de la presente invención puede producir una eficacia muy alta como composición farmacéutica para la terapia de una enfermedad provocada por un defecto de crecimiento de una célula que tiene una mutación en el gen BRAF.

Adicionalmente, según el agente supresor del crecimiento celular de la presente invención, puede suprimirse el crecimiento celular muy intensamente para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF. Por consiguiente, el agente supresor del crecimiento celular de la presente invención puede producir una eficacia muy alta como composición farmacéutica para la terapia de una enfermedad provocada por un defecto de crecimiento de una célula que tiene una mutación en el gen BRAF.

Además, según el método de selección según la presente divulgación, puede seleccionarse un fármaco para inducir la muerte celular y/o para suprimir el crecimiento celular muy intensamente para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF.

#### **Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1] La figura 1 es un diagrama característico que muestra los resultados de verificación del efecto supresor del crecimiento celular debido a la atenuación génica de GST- $\pi$  en una línea celular de cáncer colorrectal que tiene una mutación en el gen BRAF (resultados de recuento del número de células, resultados de inmunotransferencia de tipo Western).

[Figura 2] Las figuras 2 son diagramas característicos que muestran los resultados de verificación del efecto supresor del crecimiento celular debido a la atenuación génica de GST- $\pi$  en una línea celular de melanoma que tiene una mutación en el gen BRAF (resultados de recuento del número de células, resultados de inmunotransferencia de tipo Western).

[Figura 3] La figura 3 es un diagrama característico que muestra los resultados de verificación del efecto supresor del crecimiento celular cuando se usaron en combinación ARNip contra GST- $\pi$  y un inhibidor de BRAF en una línea

celular de cáncer colorrectal que tiene una mutación en el gen BRAF.

[Figura 4] Las figuras 4 son diagramas característicos que muestran los resultados de verificación del efecto supresor del crecimiento celular cuando se usaron en combinación ARNip contra GST- $\pi$  y un inhibidor de BRAF en una línea celular de melanoma que tiene una mutación en el gen BRAF.

[Figura 5] La figura 5 es un diagrama característico que muestra los resultados de verificación del efecto supresor del crecimiento celular debido a la atenuación génica de GST- $\pi$  en una línea celular de melanoma que tiene una mutación en el gen BRAF y es resistente a un inhibidor de BRAF.

[Figura 6] Las figuras 6 son fotografías de electroforesis que muestran los resultados del análisis por inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de GST- $\pi$  cuando se realizó atenuación génica de GST- $\pi$  en una línea celular de melanoma que tiene una mutación en el gen BRAF y es resistente a un inhibidor de BRAF.

## Descripción de realizaciones

El agente inductor de muerte celular y el agente supresor del crecimiento celular, así como las composiciones que comprenden los mismos, se definen en las reivindicaciones.

El agente inductor de muerte celular y el agente supresor del crecimiento celular de la presente invención comprenden un fármaco que suprime GST- $\pi$  como principio activo. El agente inductor de muerte celular y el agente supresor del crecimiento celular de la presente invención demuestran el efecto inductor de muerte celular y el efecto supresor del crecimiento celular para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF.

GST- $\pi$ , cuando se usa en la presente descripción, se refiere a una enzima que está codificada por el gen GSTP1 y cataliza la conjugación de glutatión. GST- $\pi$  está presente en diversos animales incluyendo el humano y se conoce la información de secuencia de la misma (por ejemplo, humano: NM\_000852 (NP\_000843), rata: NM\_012577 (NP\_036709), ratón: NM\_013541 (NP\_038569), etc. Los números representan números de registro de la base de datos del NCBI, los números fuera de los paréntesis son secuencias de nucleótidos y los números entre paréntesis son secuencias de aminoácidos). Como un ejemplo, la secuencia de nucleótidos en una región codificante del gen GST- $\pi$  humano registrada en la base de datos se expone en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos en la proteína GST- $\pi$  humana codificada por el gen GST- $\pi$  humano se expone en SEQ ID NO: 2.

Obsérvese que GST- $\pi$  puede especificarse por la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos específicas tal como se describió anteriormente, pero debe considerarse una mutación en la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos (incluyendo polimorfismos) posiblemente provocada entre individuos biológicos. Más específicamente, GST- $\pi$  no se limita a proteínas que tienen la secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos registrada en la base de datos, sino que incluye aquellas que tienen la misma función que GST- $\pi$  y que tienen una secuencia con 1 ó 2 o más, normalmente 1 o varios, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, aminoácidos diferentes de la secuencia anterior. Adicionalmente, GST- $\pi$  también incluye aquellas que consisten en una secuencia de nucleótidos que tiene el 70 % o más, el 80 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más o el 97 % o más de identidad con la secuencia de nucleótidos específica anterior y que codifica para una proteína que tiene la misma función que GST- $\pi$ . Obsérvese que la función específica de GST- $\pi$ , tal como se describió anteriormente, se refiere a la actividad enzimática que cataliza la conjugación de glutatión.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y los términos científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entienden habitualmente los expertos en la técnica.

Los ejemplos del "fármaco que suprime GST- $\pi$ " usado en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a los mismos, fármacos que suprimen la producción y/o la actividad de GST- $\pi$  y fármacos que facilitan la descomposición y/o la inactivación de GST- $\pi$ . Los ejemplos de los fármacos que suprimen la producción de GST- $\pi$  incluyen, pero sin limitarse a los mismos, moléculas de iARN, ribozimas, ácidos nucleicos antisentido, polinucleótidos quiméricos de ADN/ARN contra el ADN que codifica para GST- $\pi$  y vectores que expresan los mismos.

Adicionalmente, para el fármaco que suprime GST- $\pi$ , puede usarse cualquier compuesto que actúe sobre GST- $\pi$ . Los ejemplos de tales compuestos que pueden usarse incluyen compuestos orgánicos (aminoácidos, polipéptidos o derivados de los mismos, compuestos de bajo peso molecular, hidratos de carbono y compuestos de alto peso molecular) y compuestos inorgánicos. Además, estos compuestos pueden ser sustancias naturales o sustancias no naturales. Los ejemplos del derivado polipeptídico incluyen polipéptidos modificados obtenidos mediante la adición de un grupo modificador y polipéptidos variantes obtenidos mediante la variación de un residuo de aminoácido. Además, estos compuestos pueden ser un único compuesto o pueden ser una biblioteca química, productos de expresión de una biblioteca génica, extractos celulares, sobrenadantes de cultivo celular, productos de microorganismos de fermentación, extractos de organismos marinos y extractos de plantas. Más específicamente, el "fármaco que suprime GST- $\pi$ " no se limita a ácidos nucleicos tales como moléculas de iARN, sino que incluye cualquier compuesto.

- 5 Los ejemplos específicos del fármaco que suprime la actividad de GST- $\pi$  incluyen, pero sin limitarse a los mismos, sustancias que conjugan GST- $\pi$  tales como glutatión, análogos de glutatión (por ejemplo, documento WO 95/08563, documento WO 96/40205, documento WO 99/54346 y aquellas descritas en el 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, piroprost (Tew *et al.*, Cancer Res. 1988;48 (13):3622-5), anticuerpos anti-GST- $\pi$  y mutantes dominantes negativos de GST- $\pi$ . Estos fármacos están disponibles comercialmente o pueden producirse de manera adecuada basándose en tecnologías conocidas.
- 10 El fármaco que suprime la producción o la actividad de GST- $\pi$  es preferiblemente moléculas de iARN, ribozimas, ácidos nucleicos antisentido, polinucleótidos quiméricos de ADN/ARN contra el ADN que codifica para GST- $\pi$  o vectores que expresan los mismos debido a la alta especificidad y a la baja posibilidad de efectos secundarios.
- 15 La supresión de GST- $\pi$  puede determinarse basándose en la expresión o actividad de GST- $\pi$  suprimida en una célula en comparación con el caso en el que no se permitió que actúe un inhibidor de GST- $\pi$ . La expresión de GST- $\pi$  puede evaluarse mediante cualquier técnica conocida tal como, sin ninguna limitación, método de inmunoprecipitación que utiliza un anticuerpo anti-GST- $\pi$ , EIA, ELISA, IRA, IRMA, método de inmunotransferencia de tipo Western, método inmunohistoquímico, método de inmunocitoquímico, método de citometría de flujo, diversos métodos de hibridación, método de transferencia de tipo Northern, método de transferencia de tipo Southern y diversos métodos de PCR en los que un ácido nucleico es capaz de hibridarse específicamente con un ácido nucleico que codifica para GST- $\pi$  o un fragmento único del mismo o un transcrito (por ejemplo, ARNm) o un producto sometido a corte y empalme del ácido nucleico.
- 20 La actividad de GST- $\pi$  puede evaluarse analizando actividades de GST- $\pi$  conocidas tales como, sin ninguna limitación, la capacidad de unión a proteínas tales como Raf-1 (particularmente Raf-1 fosforilada) y EGFR (particularmente EGFR fosforilada) mediante cualquier método conocido tales como método de inmunoprecipitación, método de inmunotransferencia de tipo Western, espectrometría de masas, ensayo de coimmunoprecipitación (“*pull-down*”) o método de resonancia de plasmón superficial (SPR).
- 25 La molécula de iARN, cuando se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier molécula que produce interferencia por ARN e incluye, pero sin limitarse a los mismos, ARN bicatenarios tales como ARNip (ARN de interferencia pequeño), miARN (micro-ARN), ARNhc (ARN de horquilla corta), ARNdd (ARN dirigido por ADN), ARNpi (ARN de interacción con Piwi) y ARNipar (ARNip asociado a repeticiones), y variantes de los mismos. Estas moléculas de iARN están disponibles comercialmente o pueden diseñarse y fabricarse basándose en información de secuencia conocida, más específicamente la secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1 y/o la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, el ácido nucleico antisentido, cuando se usa en la presente descripción, incluye ARN, ADN, APN y complejos de los mismos.
- 30 El polinucleótido quimérico de ADN/ARN, cuando se usa en la presente descripción, incluye, pero sin limitarse a los mismos, polinucleótidos bicatenarios que consisten en ADN y ARN que inhiben la expresión de un gen diana tal como se describe en la publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2003-219893 A.
- 35 La cantidad de un principio activo que va a añadirse al agente o a la composición de la presente invención puede ser una cantidad que induce la muerte celular tal como apoptosis y/o que suprime el crecimiento celular cuando se administra el agente o la composición. Adicionalmente, es preferible una cantidad que no provoque efectos perjudiciales que superen los beneficios obtenidos a partir de la administración. Tal cantidad es conocida o se determina de manera adecuada mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas o una prueba en un animal modelo tal como un ratón, una rata, un perro o un cerdo, y estos métodos de prueba son bien conocidos por los expertos en la técnica. La inducción de apoptosis puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas usando la
- 40 detección de fenómenos distintivos de la apoptosis tales como fragmentación de ADN, unión de anexina V a una membrana celular, cambios en el potencial de membrana mitocondrial o activación de tinción de caspasa o TUNEL. Además, la supresión del crecimiento celular puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas tales como recuento del número de células viables a lo largo del tiempo, medición del tamaño, volumen y peso de un tumor, medición de la cantidad de síntesis de ADN, método de WST-1, método de BrdU (bromodesoxiuridina) o método de incorporación de 3H-timidina. La cantidad de un componente activo que va a añadirse es variable dependiendo de la forma de medicamento del agente y composición. Por ejemplo, cuando se usan múltiples unidades de la composición para una administración única, la cantidad de un principio activo añadido a una composición unitaria individual puede ser una de múltiples unidades iguales de la cantidad del principio activo requerida para una administración única. Tal cantidad que va a añadirse puede ajustarse de manera adecuada por los expertos en la
- 45 técnica.
- 50 Adicionalmente, la adición del fármaco que suprime GST- $\pi$  como principio activo permite la producción del agente inductor de muerte celular, el agente supresor del crecimiento celular, la composición inductora de muerte celular o la composición supresora del crecimiento celular.
- 55
- 60
- 65

Además, puede proporcionarse el fármaco que suprime GST- $\pi$  usado para la inducción de muerte celular o la supresión del crecimiento celular. Además, puede proporcionarse el método para inducir la muerte celular o el método para suprimir el crecimiento celular que comprende administrar una cantidad eficaz del fármaco que suprime GST- $\pi$ .

5 Obsérvese que ambos de los métodos o usos anteriores de inducción de muerte celular tal como apoptosis o supresión del crecimiento celular pueden ser métodos *in vitro* o métodos *in vivo*. Adicionalmente, el fármaco para estos métodos es tal como ya se describió anteriormente y la cantidad eficaz del fármaco puede ser una cantidad que induce la muerte celular o suprime el crecimiento celular en una célula a la que se administra el fármaco.  
10 Adicionalmente, es preferible una cantidad que no provoque efectos perjudiciales que superen los beneficios obtenidos a partir de la administración. Tal cantidad es conocida o puede determinarse de manera adecuada, por ejemplo, mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas y similares, y el método de prueba es bien conocido por los expertos en la técnica. La inducción de muerte celular o la supresión del crecimiento celular puede evaluarse mediante diversas técnicas conocidas incluyendo las descritas anteriormente. No es necesario que la cantidad eficaz anterior, cuando se administra el fármaco a un grupo especificado de células cancerosas, sea la cantidad que siempre provoca la muerte celular o la supresión del crecimiento de todas las células en el grupo de células. Por ejemplo, la cantidad eficaz anterior puede ser una cantidad que provoca la apoptosis o la supresión del crecimiento del 1 % o más, el 2 % o más, el 3 % o más, el 4 % o más, el 5 % o más, el 6 % o más, el 8 % o más, el 10 % o más, el 12 % o más, el 15 % o más, el 20 % o más o adicionalmente el 25 % o más de las células en el grupo de células anterior.

El agente inductor de muerte celular y el agente supresor del crecimiento celular de la presente invención actúan sobre una célula que tiene una mutación en el gen BRAF. La célula que tiene una mutación en el gen BRAF es una célula que demuestra un defecto de crecimiento debido a una mutación en el gen BRAF (normalmente, células cancerosas).

Particularmente, el agente inductor de muerte celular y el agente supresor del crecimiento celular de la presente invención se aplican preferiblemente a una célula con alta expresión de GST- $\pi$  (normalmente, una célula cancerosa con alta expresión de GST- $\pi$ ) entre las células que demuestran un defecto de crecimiento debido a una mutación en el gen BRAF. La célula cancerosa con alta expresión de GST- $\pi$  usada en el presente documento significa una célula que tiene un nivel de expresión de GST- $\pi$  significativamente mayor en comparación con una célula normal entre las células que tienen una mutación en el gen BRAF y que demuestran un defecto de crecimiento celular. Obsérvese que el nivel de expresión de GST- $\pi$  puede medirse según un método de rutina tal como RT-PCR o microalineamiento.

La mutación en el gen BRAF significa una mutación tal como delección, sustitución, adición, inserción en una secuencia de aminoácidos de BRAF de tipo natural y una mutación en una región de control de la expresión del gen BRAF. Obsérvese que la mutación en el gen BRAF en el presente documento es la denominada mutación de ganancia de función. Más específicamente, el gen BRAF que tiene una mutación (algunas veces denominado gen BRAF mutante) incluye genes que codifican para BRAF mutante con actividad serina treonina cinasa aumentada provocada por la mutación. Adicionalmente, el gen BRAF mutante también incluye aquellos que tienen una mutación en una región de control de la expresión y un nivel de expresión aumentado en comparación con el gen BRAF de tipo natural. Más específicamente, una célula que expresa el gen BRAF mutante tiene la característica de mantener constantemente la señalización aguas abajo (por ejemplo, señalización a MEK) a partir de BRAF mediante la expresión de BRAF mutante o el aumento del nivel de expresión de BRAF.

Los ejemplos del gen BRAF mutante incluyen genes que codifican para BRAF mutante en los que la valina codificada por el codón 600 en el gen BRAF de tipo natural se sustituye por ácido glutámico (indicado como V600E; a continuación en el presente documento se hace referencia a lo mismo) tal como V600D, V600G, V600K, V600M, V600R, V600L, G469A, G469V, D594N y V600insT (inserción de T).

Por tanto, el agente inductor de muerte celular y el agente supresor del crecimiento celular comprendidos en las composiciones de la presente invención y tal como se definen en las reivindicaciones capaces de inducir la muerte celular o suprimir el crecimiento celular eficazmente incluso para una célula cancerosa que tiene una mutación en el gen BRAF son eficaces como componentes de una composición farmacéutica para una enfermedad provocada por un defecto de crecimiento de una célula cancerosa que tiene una mutación en el gen BRAF. Adicionalmente, la formulación del fármaco que suprime GST- $\pi$  como principio activo permite la producción de la composición farmacéutica para una enfermedad provocada por el defecto de crecimiento de una célula cancerosa que tiene una mutación en el gen BRAF. Además, una enfermedad provocada por el defecto de crecimiento celular puede someterse a tratamiento y terapia comprendiendo la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica producida a un sujeto que lo necesita.

La composición farmacéutica, tal como se definen en las reivindicaciones, es eficaz para tratar una enfermedad provocada por el defecto de crecimiento de una célula cancerosa que tiene una mutación en el gen BRAF. La enfermedad provocada por una célula cancerosa que tiene una mutación en el gen BRAF no está limitada e incluye

cánceres con alta expresión de GST- $\pi$ , y en muchos casos, en el cáncer con alta expresión de GST- $\pi$ , se abarcan cánceres que tienen una mutación en el gen BRAF.

Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a los mismos, sarcomas tales como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, rhabdomioma, leiomioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangiosarcoma, sarcoma sinovial, condrosarcoma y osteosarcoma, carcinomas tales como cáncer de ojo, cáncer de tiroides (cáncer papilar), cáncer de meninges, tumor cerebral, cáncer de hipófisis, cáncer de glándulas salivales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón (cáncer no microcítico), cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de duodeno, cáncer de apéndice, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer anal, cáncer de riñón, cáncer ureteral, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer uterino (cáncer endometrial), cáncer de ovario (cáncer seroso de ovario), cáncer de vulva, cáncer de vagina y cáncer de piel (melanoma maligno), y adicionalmente leucemia y linfoma maligno. Obsérvese que el "cáncer" en la presente invención incluye tumor maligno epitelial y tumor maligno no epitelial. El cáncer en la presente invención puede estar presente en cualquier parte del cuerpo incluyendo cerebro, cabeza y cuello, tórax, extremidad, pulmón, corazón, timo, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon), intestino grueso (colon, ciego, apéndice, recto), hígado, páncreas, vesícula biliar, ano, riñón, uréter, vejiga, próstata, pene, testículo, útero, ovario, vulva, vagina, piel, músculo estriado, músculo liso, membrana sinovial, cartílago, hueso, tiroides, glándula suprarrenal, peritoneo, mesenterio, médula ósea, sangre, sistema vascular, sistema linfático tal como ganglio linfático y líquido linfático.

Particularmente, el agente inductor de muerte celular y el agente supresor del crecimiento celular comprendidos en las composiciones de la presente invención pueden inducir la muerte celular o suprimir el crecimiento celular eficazmente incluso para una célula que ha adquirido resistencia a un inhibidor de BRAF entre las células que tienen una mutación en el gen BRAF. Por consiguiente, el agente inductor de muerte celular o el agente supresor del crecimiento celular comprendido en las composiciones de la presente invención es eficaz como componente de una composición farmacéutica para una enfermedad provocada por el defecto de crecimiento de una célula cancerosa que tiene una mutación en el gen BRAF y resistencia a un inhibidor de BRAF. Adicionalmente, la formulación del fármaco que suprime GST- $\pi$  como principio activo permite la producción de la composición farmacéutica para una enfermedad provocada por el defecto de crecimiento de una célula cancerosa que tiene una mutación en el gen BRAF y resistencia a un inhibidor de BRAF. Además, una enfermedad provocada por el defecto de crecimiento celular puede someterse a tratamiento y terapia comprendiendo la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica producida a un sujeto que lo necesita, es decir, a un paciente con un efecto terapéutico reducido mediante un inhibidor de BRAF.

El inhibidor de BRAF usado en el presente documento significa una sustancia que inhibe la transducción de señales a partir de BRAF aguas abajo, particularmente la sustancia que inhibe específicamente la transducción de señales provocada por BRAF mutante que tiene la mutación de ganancia de función descrita anteriormente. Los ejemplos del inhibidor de BRAF conocido incluyen vemurafenib ((PLX4032), n.º de CAS: 918504-65-1, N-[3-[5-(4-clorofenil)-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-carbonil]-2,4-difluorofenil]propano-1-sulfonamida) y PLX4720 (n.º de CAS: 918505-84-7, N-[3-(5-cloro-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-carbonil)-2,4-difluorofenil]propano-1-sulfonamida).

Además, los ejemplos del inhibidor de BRAF incluyen regorafenib, dasatinib, PLX-8394, BeiGene-283, PLX-3603, RG-7304 (n.º de CAS: 213406-50-9), LY-3009120 (n.º de CAS: 1454682-72-4), rebastinib (n.º de CAS: 1020172-07-9), análogos de 1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-carboxamida, ASN-003, profármaco de vemurafenib, derivados de N-(tiofen-2-il)benzamida, DCB-R0237, REDX-04988, EBI-907, EBI-945, gosipina, nanolipolee-007, TEW-0201, miARN-3157 y derivados de tiazol (NMS-P186, NMS-P285, NMS-P349, NMS-P383, NMS-P396 y NMS-P730).

Además, los ejemplos del inhibidor de BRAF incluyen, además de los anteriores, SB590885 (n.º de CAS: 405554-55-4, N,N-dimetil-2-[4-[(4Z)-4-(1-nitroso-2,3-dihidroinden-5-iliden)-5-(1H-piridin-4-iliden)-1H-imidazol-2-il]fenoxi]etanamina), inhibidor de B-Raf 1 (n.º de CAS: 1093100-40-3, 1-N-(4-clorofenil)-6-metil-S-N-[3-(7H-purin-6-il)piridin-2-il]isoquinolin-1,5-diamina), diclorhidrato de inhibidor de B-Raf 1 (n.º de CAS: 1191385-19-9, diclorhidrato de 1-N-(4-clorofenil)-6-metil-5-N-[3-(7H-purin-6-il)piridin-2-il]isoquinolin-1,5-diamina), dabrafenib (n.º de CAS: 1195765-45-7, N-[3-[5-(2-aminopirimidin-4-il)-2-terc-butil-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil]-2,6-difluorobencenosulfonamida), LGX818 (n.º de CAS: 1269440-17-6, N-[(2S)-1-[[4-[3-[5-cloro-2-fluoro-3-(metanosulfonamido)fenil]-1-propan-2-il]pirazol-4-il]pirimidin-2-il]amino]propan-2-il]carbamato de metilo), HG6-64-1 (n.º de CAS: 1315329-43-1, véase el documento WO 2011/090738), PF-04880594 (n.º de CAS: 1111636-35-1, 3-[[4-[1-(2,2-difluoroetil)-3-(1H-pirrol-2,3-b]piridin-5-il)pirazol-4-il]pirimidin-2-il]amino]propanonitrilo), inhibidor de BRAF (n.º de CAS: 918505-61-0, N-[2,4-difluoro-3-(5-piridin-3-il-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-carbonil)fenil]propano-2-sulfonamida), inhibidor de B-Raf (n.º de CAS: 1315330-11-0, N-[4-[(4-etilpiperazin-1-il)metil]-3-(trifluorometil)fenil]-4-metil-3-[(6-metil-7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)oxi]benzamida), TAK-632 (n.º de CAS: 1228591-30-7), N-[7-ciano-6-[4-fluoro-3-[[2-[3-(trifluorometil)fenil]acetil]amino]fenoxi]-1,3-benzotiazol-2-il]ciclopropanocarboxamida, AZ 628 (n.º de CAS: 878739-06-1, 3-(2-cianopropan-2-il)-N-[4-metil-3-[(3-metil-4-oxoquinazolin-6-il)amino]fenil]benzamida), RAF265 (n.º de CAS: 927880-90-8, 1-metil-5-[2-[5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il]piridin-4-il]oxi-N-[4-(trifluorometil)fenil]bencimidazol-2-amina), CEP-32496 (n.º de CAS: 1188910-76-0, 1-[3-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)oxifenil]-3-[5-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)-1,2-oxazol-3-il]urea), GDC-0879 (n.º de CAS: 905281-76-7, 2-[4-[(1E)-1-hidroxiimino-2,3-dihidroinden-5-il]-3-piridin-4-il]pirazol-1-il]etanol), tosilato de sorafenib (n.º de CAS: 475207-

59-1, ácido 4-metilbencenosulfónico de 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metilpiridin-2-carboxamida), mesilato de dabrafenib (n.º de CAS: 1 195768-06-9, ácido metanosulfónico de N-(3-[5-(2-aminopirimidin-4-il)-2-terc-butil-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil]-2,6-difluorobencenosulfonamida), clorhidrato de CEP-32496 (n.º de CAS: 1227678-26-3, clorhidrato de 1-[3-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)oxifenil]-3-[5-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)-1,2-oxazol-3-il]urea) y sorafenib (n.º de CAS: 284461-73-0, 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metilpiridin-2-carboxamida).

La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse en combinación con otros principios activos distintos del fármaco que suprime GST- $\pi$ . El uso en combinación en el presente documento incluye, por ejemplo, la administración de otros principios activos como preparaciones farmacéuticas independientes y la administración de otros principios activos en forma de un agente de combinación con al menos uno de otros fármacos. Cuando se administran otros principios activos como preparaciones farmacéuticas independientes, puede administrarse una preparación que contiene otros principios activos antes de las otras preparaciones, junto con las otras preparaciones o después de las otras preparaciones.

Para tales otros principios activos, pueden usarse de manera adecuada los inhibidores de BRAF anteriores. Adicionalmente, los otros principios activos también incluyen aquellos eficaces para tratar una enfermedad objetivo. Por ejemplo, cuando la enfermedad que va a tratarse es un cáncer, puede usarse un agente antineoplásico en combinación. Los ejemplos del agente antineoplásico incluyen agentes alquilantes tales como ifosfamida, clorhidrato de nimustina, ciclofosfamida, dacarbazina, melfalán y ranimustina, antimetabolitos tales como clorhidrato de gemcitabina, encitabina, citarabina-ocfosfato, preparaciones de citarabina, tegafur-uracilo, agentes de combinación de tegafur-gimeracilo-oteracilo de potasio (por ejemplo, TS-1), doxifluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato y mercaptopurina, antibióticos antitumorales tales como clorhidrato de idarrubicina, clorhidrato de epirubicina, clorhidrato de daunorrubicina, citrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de pirarubicina, clorhidrato de bleomicina, sulfato de peplomicina, clorhidrato de mitoxantrona y mitomicina C, alcaloides tales como etopósido, clorhidrato de irinotecán, ditratrato de vinorelbina, docetaxel hidratado, paclitaxel, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina y sulfato de vinblastina, agentes de terapia hormonal tales como anastrozol, citrato de tamoxifeno, citrato de toremifeno, bicalutamida, flutamida y fosfato de estramustina, complejos de platino tales como carboplatino, cisplatino (CDDP) y nedaplatino, inhibidores angiogénicos tales como talidomida, neovastat y bevacizumab y L-asparaginasa.

Cuando el componente activo en cada uno de los agentes, las composiciones y el método de tratamiento de la presente invención descritos en la presente descripción es un ácido nucleico tal como una molécula de iARN, una ribozima, un ácido nucleico antisentido o un polinucleótido quimérico de ADN/ARN, éstos pueden usarse directamente como ácido nucleico desnudo o también pueden soportarse por diversos vectores. Para el vector, puede emplearse cualquiera de los vectores conocidos tales como vectores de plásmidos, vectores de fagos, vectores de fagémidos, vectores de cósmidos, vectores de virus. El vector contiene preferiblemente al menos un promotor que potencia la expresión del ácido nucleico que va a soportarse, y el ácido nucleico en este caso está preferiblemente ligado de manera operativa a un promotor. El ácido nucleico ligado de manera operativa a un promotor significa que el ácido nucleico y el promotor están posicionados de modo que la proteína codificada por el ácido nucleico puede producirse de manera adecuada por la acción del promotor. El vector puede ser replicable o no en una célula huésped, y la transcripción del gen puede llevarse a cabo fuera o dentro del núcleo en la célula huésped. En este último caso, el ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula huésped.

Adicionalmente, el principio activo también puede soportarse por diversos portadores proteicos y lipídicos no virales. Un portador de este tipo no está limitado y los ejemplos incluyen colesteroles, liposomas, promotores de anticuerpos, nanopartículas de ciclodextrina, péptidos fusionados, aptámeros, polímeros y copolímeros de poli(ácido láctico) biodegradables, mediante los cuales puede aumentarse la eficiencia de incorporación intracelular (por ejemplo, véase Pirollo y Chang, Cancer Res. 2008; 68(5):1247-50, etc.). Son particularmente útiles los polímeros y los liposomas catiónicos (por ejemplo, polietilenimina, etc.). Los ejemplos adicionales del polímero útil como portador de este tipo incluyen los descritos en los documentos US 2008/0207553 y US 2008/0312174.

Para cada composición farmacéutica de la presente invención descrita en la presente descripción, el componente activo puede combinarse con otros componentes opcionales siempre que no se vean afectados los efectos del componente activo. Los ejemplos del componente opcional incluyen otros agentes quimioterápicos, portadores, excipientes y diluyentes farmacológicamente aceptables. Además, dependiendo de la vía de administración y del modo de liberación del fármaco, la composición anterior también puede recubrirse con un material adecuado, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material de disgregación programado, o incorporarse en un sistema de liberación de fármaco adecuado.

Cada agente y composición (incluyendo cada composición farmacéutica) de la presente invención descritos en la presente descripción pueden administrarse por diversas vías incluyendo tanto oral como parenteral, y los ejemplos de la vía de administración incluyen, pero sin limitarse a las mismas, oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, local, intratumoral, intrarrectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosa, transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intrapulmonar e intrauterina, o puede prepararse en una forma de dosificación adecuada para cada vía de administración. Puede emplearse de manera adecuada cualquier forma de dosificación y método de

preparación conocido (por ejemplo, véase "Hyojun Yakuzaijaku ("Standard Pharmaceuticals" en inglés), editado por Yoshiteru Watanabe *et al.*, Nankodo, 2003, etc.).

La forma de dosificación adecuada para administración oral no está limitada y los ejemplos incluyen polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, disoluciones, suspensiones, emulsiones, geles y jarabes, y los ejemplos de la forma de dosificación adecuada para administración parenteral incluyen inyecciones tales como inyecciones en disolución, inyecciones en suspensión, inyecciones en emulsión e inyecciones preparadas de manera extemporánea. La preparación para administración parenteral puede estar en forma de una suspensión o disolución estéril isotónica acuosa o no acuosa.

Cada agente o composición (incluyendo cada composición farmacéutica) de la presente invención descrito en la presente descripción también puede dirigirse a una célula o a un tejido específico. El direccionamiento puede lograrse mediante cualquier técnica conocida. Cuando pretende administrarse a un cáncer, los ejemplos de las técnicas que pueden usarse incluyen, pero sin limitarse a las mismas, direccionamiento pasivo en el que la preparación se dimensiona preferiblemente a un diámetro de 50 a 200 nm, particularmente de 75 a 150 nm, para producir efectos de EPR (retención y permeabilidad potenciadas) y direccionamiento activo en el que, como agente de direccionamiento, se utiliza un ligando tal como CD19, HER2, receptor de transferrina, receptor de ácido fólico, receptor de VIP, EGFR (Torchilin, AAPS J. 2007; 9(2): E128-47), RAAG10 (publicación de patente japonesa (Kohyo) n.º 2005-532050), PIPA (publicación de patente japonesa (Kohyo) n.º 2006-506071) o KID3 (publicación de patente japonesa (Kohyo) n.º 2007-529197), un péptido que tiene un motivo RGD o un motivo NGR, F3 o LyP-1 (Ruoslahti *et al.*, J Cell Biol. 2010;188(6):759-68). Además, también se sabe que el retinoide y un derivado del mismo son útiles como agente de direccionamiento a una célula cancerosa (documento WO 2008/120815) y, por tanto, también puede utilizarse un portador que contiene retinoide como agente de direccionamiento. Los portadores se describen en los documentos WO2009/036368, WO 2010/014117 y WO 2012/170952 además de las bibliografías anteriores.

Cada agente o composición (incluyendo cada composición farmacéutica) de la presente invención descrito en la presente descripción puede suministrarse en cualquier forma y, desde el punto de vista de la estabilidad en almacenamiento, puede proporcionarse en una forma que puede prepararse de manera extemporánea tal como la forma que puede prepararse en un centro médico o cerca del centro por parte de un doctor y/o un farmacéutico, una enfermera u otros paramédicos. Una forma de este tipo es particularmente útil cuando el agente o la composición de la presente invención contiene componentes que son difíciles de almacenar de manera estable tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En este caso, el agente o la composición de la presente invención se proporciona en 1 ó 2 o más recipientes que contienen al menos un elemento esencial para el mismo y se prepara antes de su uso, por ejemplo, en el plazo de 24 horas, preferiblemente antes de 3 horas, más preferiblemente inmediatamente antes de su uso. Para la preparación, pueden usarse de manera adecuada un reactivo, un disolvente y equipos de preparación disponibles habitualmente en un centro de preparación.

En el presente documento también se divulga un kit de preparación de composición que incluye 1 ó 2 o más recipientes que contienen los componentes activos, que pueden estar contenidos en cada agente o composición de la presente invención, individualmente o en combinación, y también elementos esenciales de cada agente o composición que van a proporcionarse en forma de un kit de este tipo. El kit puede incluir, además de lo anterior, instrucciones que describen el método de preparación y el método de administración de cada agente o composición de la presente invención tales como información escrita y un medio de almacenamiento digital como un CD o DVD. Adicionalmente, el kit puede incluir todos los elementos esenciales para completar cada agente o composición de la presente invención, pero no siempre es necesario que incluya todos los elementos. Por tanto, el kit puede no incluir un reactivo y un disolvente disponibles habitualmente en los centros médicos y las instalaciones experimentales tales como agua esterilizada, solución salina fisiológica y disolución de glucosa.

La cantidad eficaz en cada uso en un método de tratamiento de la presente invención descrito en la presente descripción es, por ejemplo, una cantidad que alivia un síntoma de una enfermedad o retrasa o detiene el progreso de una enfermedad, preferiblemente una cantidad que suprime o recupera una enfermedad. Adicionalmente, es preferible una cantidad que no provoque efectos perjudiciales que superen los beneficios obtenidos a partir de la administración. Tal cantidad se determina de manera adecuada mediante una prueba *in vitro* usando células cultivadas o una prueba en un animal modelo tal como un ratón, una rata, un perro o un cerdo, y estos métodos de prueba son bien conocidos por los expertos en la técnica. La dosis de fármaco usada en el método de tratamiento de la presente invención es conocida por los expertos en la técnica o puede determinarse de manera adecuada mediante las pruebas anteriores.

La dosis específica de componente activo administrada en el uso en un método de tratamiento de la presente invención descrito en la presente descripción puede determinarse teniendo en cuenta diversas condiciones de un sujeto que necesita el tratamiento, tales como el grado de gravedad de los síntomas, las condiciones generales de salud del sujeto, la edad, el peso corporal y el sexo del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de administración, fármacos administrados conjuntamente, la reactividad a la terapia, la forma de dosificación y el cumplimiento de la terapia.

La vía de administración incluye diversas vías incluyendo tanto oral como parenteral, tales como oral, intravenosa,

intramuscular, subcutánea, local, intratumoral, intrarrectal, intraarterial, intraportal, intraventricular, transmucosa, transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intrapulmonar e intrauterina.

5 La frecuencia de administración varía dependiendo de la propiedad del agente o la composición usado y de las condiciones del sujeto incluyendo las anteriores, pero puede ser, por ejemplo, múltiples veces al día (más específicamente, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces o más al día), una vez al día, cada varios días (más específicamente, cada 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días), cada semana, cada varias semanas (más específicamente, cada 2, 3 ó 4 semanas).

10 El término "sujeto" usado en la presente descripción significa cualquier individuo biológico, preferiblemente animales, de manera adicionalmente preferible mamíferos, de manera adicionalmente preferible individuos humanos. En la presente invención, el sujeto puede estar sano o afectado por una enfermedad, pero cuando se prevé un tratamiento para una enfermedad específica, el sujeto normalmente significa un sujeto que está afectado por, o es susceptible de verse afectado por, la enfermedad.

15 Adicionalmente, el término "tratamiento", cuando se usa en la presente descripción, abarca todas las clases médicamente aceptables de intervención preventiva y/o terapéutica con el propósito de recuperación, remisión temporal o prevención de una enfermedad. Por ejemplo, el término "tratamiento" abarca intervenciones médicamente aceptables con diversos propósitos incluyendo retrasar o detener el progreso de una enfermedad, remitir o hacer desaparecer una lesión, prevenir la aparición o prevenir la recidiva.

20 El fármaco que suprime GST- $\pi$  demuestra la inducción de muerte celular y/o la supresión del crecimiento celular para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF tal como se describió anteriormente. Por tanto, con la supresión de GST- $\pi$  como indicador, puede seleccionarse el agente inductor de muerte celular y/o el agente supresor del crecimiento celular para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF. Más específicamente, una sustancia capaz de suprimir GST- $\pi$  puede ser una sustancia candidata para el agente inductor de muerte celular y/o el agente supresor del crecimiento celular para una célula que tiene una mutación en el gen BRAF (normalmente, células cancerosas).

25 Por ejemplo, se pone en contacto una sustancia de prueba con una célula cancerosa que tiene una mutación en el gen BRAF, como un ejemplo de la célula cancerosa, para medir el nivel de expresión de GST- $\pi$  en la célula. Cuando el nivel de expresión en el caso del contacto con la sustancia de prueba se reduce en comparación con el nivel de expresión medido en ausencia de la sustancia de prueba, puede seleccionarse la sustancia de prueba como sustancia candidata para el fármaco que suprime GST- $\pi$ .

30 La sustancia de prueba en el presente documento no está limitada y puede ser cualquier sustancia. La sustancia de prueba puede ser una única sustancia o una mezcla que consiste en una pluralidad de componentes constituyentes. La sustancia de prueba puede tener una composición que contiene sustancias no identificadas como un extracto de un microorganismo o un caldo de cultivo o una composición que contiene composiciones conocidas en una razón de composición predeterminada. Adicionalmente, la sustancia de prueba puede ser cualquiera de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos.

### Ejemplos

35 A continuación en el presente documento, la presente invención se describe adicionalmente en detalle con referencia a ejemplos, pero el alcance técnico de la presente invención no se limita a los mismos.

#### [Ejemplo 1]

40 En el presente ejemplo, se estudió el efecto supresor del crecimiento celular cuando se permitió que el fármaco que suprime GST- $\pi$  actuara sobre una célula que tiene una mutación en el gen BRAF. En primer lugar, como célula cancerosa que tiene una mutación (V600E) en el gen BRAF, se cultivaron 1 especie de una línea celular de cáncer colorrectal (CACO-2) y 4 especies de líneas celulares de melanoma (A375, SK-MEL-28, A2058, Malme-3M) a 37 °C bajo una atmósfera que contenía el 5 % de CO<sub>2</sub>. Los medios usados fueron MEM+20 %, FBS+0,1 mM y NEAA para CACO-2, DMEM+15 % y FBS para A375, EMEM+10 % y FBS para SK-MEL-28, DMEM+10 % y FBS para A2058 e IMDM+20 % y FBS para Malme-3M, a todos los cuales se les añadió un antibiótico.

45 El día antes de la transfección, se inoculó cada célula en una placa de histocultivo de plástico de 100 mm usando medio libre de antibiótico de modo que se logró una confluencia del 10 al 20 %. Se añadieron 600 pmol de ARNip contra GST- $\pi$  (GGGAGGCAAGACCUUCAUUTT, ID de ARNip #2385, Ambion (SEQ ID NO: 3)) a 1 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I (GIBCO) y se agitaron suavemente. Posteriormente, se diluyeron 35  $\mu$ l de Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) con 1 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I (GIBCO) y se agitaron suavemente. Se agitaron suavemente el ARNip contra GST- $\pi$  diluido y Lipofectamine RNAi MAX diluido y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Mientras tanto, se reemplazó el medio con 10 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I. Después de la incubación de 10 minutos, se añadió el complejo de ARNip contra GST- $\pi$  y

Lipofectamine RNAi MAX a la célula y se incubó a 37 °C bajo una atmósfera que contenía el 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación de 5 horas, se reemplazó el medio con 10 ml de medio libre de antibiótico. Se lavó el medio con PBS 1 hora después del reemplazo, se desprendieron las células usando tripsina al 0,25 %-EDTA (SIGMA) y se suspendieron en medio que contiene antibiótico. Se suspendieron las células en 5 ml de medio y se inocularon en una placa de histocultivo de plástico de 60 mm (CACO-2: 0,4 × 10<sup>5</sup> células, A375: 1,0 × 10<sup>5</sup> células, SK-MEL-28: 0,2 × 10<sup>5</sup> células, A2058: 0,8 × 10<sup>5</sup> células, Malme-3M: 0,6 × 10<sup>5</sup> células).

Se llevó a cabo la misma operación como experimentos de control usando ARNip al azar (CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUGCAG, Hokkaido System Science Co., Ltd. (SEQ ID NO: 4)) o ARNip de control negativo AllStars (siControl) (QIAGEN). Después de la transfección de ARNip contra GST- $\pi$ , se contó el número de células el día 0 y el día 5, respectivamente.

Adicionalmente, en el presente ejemplo, se confirmó la expresión de GST- $\pi$  mediante inmunotransferencia de tipo Western respectivamente cuando se permitió que ARNip contra GST- $\pi$  actuara sobre células CACO-2, células A375, células SK-MEL-28, células A2058 y células Malme-3M. Más específicamente, usando la célula recogida 3 días después de la transfección de ARNip contra GST- $\pi$ , se llevó a cabo el análisis por inmunotransferencia de tipo Western sobre la atenuación génica de GST- $\pi$ . En primer lugar se lavaron las células recogidas con PBS fría, a las cuales se les añadió tampón de lisis frío (NP-40 al 1 %, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, complete Mini libre de EDTA (Roche) y PhosSTOP (Roche)), se enfriaron con hielo y se incubaron durante 30 minutos para su solubilización. Posteriormente, se llevó a cabo la centrifugación a 4 °C, 15000 rpm durante 15 minutos, obteniéndose de ese modo un extracto celular. Se determinaron cuantitativamente las proteínas para el extracto celular obtenido usando el kit de ensayo de proteínas Micro BCA (Thermo SCIENTIFIC). A continuación, se desnaturalizaron 20  $\mu$ g del extracto celular en condiciones reductoras y se llevó a cabo SDS-PAGE usando MULTIGEL II mini 4/20 (13 W) (Cosmo Bio) para separar las proteínas. Después de completarse la SDS-PAGE, se transcribieron las proteínas a una membrana de PVDF usando un aparato de transferencia de tanque. Se incubó la membrana de transferencia en PBS con leche desnatada al 5 %/Tween 20 al 0,05 % (abreviado como PBS-T) a 4 °C durante 16 horas para llevar a cabo el bloqueo. Posteriormente, se hizo reaccionar la membrana con un anticuerpo anti-GST- $\pi$  (MBL) diluido con disolución de bloqueo de membrana (Invitrogen) a 4 °C durante 16 horas. Se llevó a cabo la reacción con anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1 hora usando un anticuerpo de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se llevó a cabo la detección de señales de banda sobre una película de rayos X mediante el método de quimioluminiscencia usando reactivos de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL (GE Healthcare). Se llevó a cabo lavado entre cada una de las operaciones mediante agitación durante 5 minutos, 4 veces usando PBS-T.

Los resultados sobre la línea celular de cáncer colorrectal se muestran en la figura 1 y los resultados sobre la línea celular de melanoma se muestran en la figura 2. Obsérvese que las figuras 1 y 2 juntas muestran los resultados del recuento del número de células y los resultados del análisis por inmunotransferencia de tipo Western. Tal como aparece en las figuras 1 y 2, tanto en la línea celular de cáncer colorrectal como en la línea celular de melanoma, se suprimió notablemente la capacidad de crecimiento celular debido a la atenuación génica de GST- $\pi$  mediante ARNip contra GST- $\pi$ , que es el fármaco que suprime GST- $\pi$ , en las células cancerosas que tienen una mutación en el gen BRAF. La mutación en el gen BRAF se encontró en tumores de alta malignidad y se conoce, en los cánceres colorrectales, como factor de mal pronóstico en cánceres colorrectales no resecables. La mitad de los pacientes con melanoma tienen mutaciones en el gen BRAF, y cuando un potencial metastásico es alto, la letalidad y malignidad son las más altas. Los resultados del presente ejemplo sugieren que el fármaco que suprime GST- $\pi$  es eficaz sobre la supresión del crecimiento celular de células cancerosas que tienen una mutación en el gen BRAF, aumentado de ese modo las expectativas para una nueva terapia en estos cánceres resistentes al tratamiento.

[Ejemplo 2]

En el presente ejemplo, se estudió el efecto supresor del crecimiento celular cuando se permitió que el fármaco que suprime GST- $\pi$  y un inhibidor de BRAF actuaran sobre una célula que tiene una mutación en el gen BRAF.

En primer lugar, se cultivaron respectivamente 1 especie de una línea celular de cáncer colorrectal (CACO-2) y 2 especies de líneas celulares de melanoma (SK-MEL-28 y A2058) de la misma manera que en el ejemplo 1 y, el día antes de la transfección, se inocularon en una placa de histocultivo de plástico de 100 mm usando medio libre de antibiótico de modo que se logró una confluencia del 10 al 20 %. Se añadieron 600 pmol de ARNip contra GST- $\pi$  (GGGAGGCAAGACCUUCAUUTT, ID de ARNip #2385, Ambion (SEQ ID NO: 3)) a 1 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I (GIBCO) y se agitaron suavemente. Posteriormente, se diluyeron 35  $\mu$ l de Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) con 1 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I (GIBCO) y se agitaron suavemente. Se agitaron suavemente el ARNip contra GST- $\pi$  diluido y Lipofectamine RNAi MAX diluido y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Mientras tanto, se reemplazó el medio con 10 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I. Después de la incubación de 10 minutos, se añadió el complejo de ARNip contra GST- $\pi$  y Lipofectamine RNAi MAX a la célula y se incubó a 37 °C bajo una atmósfera que contenía el 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación de 5 horas, se reemplazó el medio con 10 ml de medio libre de antibiótico. Se lavó el medio con PBS 1 hora después del reemplazo, se desprendieron las células usando tripsina al 0,25 %-EDTA (SIGMA) y se

suspendieron en medio que contiene antibiótico. Se suspendieron las células en 5 ml de medio y se inocularon en una placa de histocultivo de plástico de 60 mm (CACO-2:  $0,4 \times 10^5$  células, SK-MEL-28:  $0,2 \times 10^5$  células y A2058:  $0,8 \times 10^5$  células). Se llevó a cabo la misma operación como experimento de control usando ARNip de control negativo AllStars (siControl) (QIAGEN). El día 1 a partir de la transfección, se añadió PLX4720 (Selleck), un inhibidor de BRAF, al medio para lograr  $40 \mu\text{M}$  para CACO-2,  $0,7 \mu\text{M}$  para SK-MEL-28 y  $10 \mu\text{M}$  para A2058 y se continuó el cultivo hasta el día 5. Se cultivó el control tratado con PLX4720 mediante la adición de un disolvente de DMSO (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Se llevó a cabo el ensayo de crecimiento contando el número de células desde el día 0 hasta el día 5 después de la transfección.

La figura 3 muestra los resultados sobre el recuento del número de células de CACO-2 y la figura 4 muestra los resultados sobre el recuento del número de células de SK-MEL-28 y A2058. Tal como resulta evidente en la figura 3, se sugirió que, en comparación con el caso en el que se permitió que el ARNip contra GST- $\pi$  actuara individualmente sobre la línea celular de cáncer colorrectal (línea CACO-2 que tiene una mutación en el gen BRAF) o el caso en el que se permitió que PLX4720 actuara sobre la línea celular de cáncer colorrectal junto con siControl, el efecto supresor del crecimiento celular fue considerable en el caso en el que se permitió que el ARNip contra GST- $\pi$  y PLX4720 actuaran en combinación sobre una línea celular de este tipo. Además, tal como resulta evidente en la figura 4, se sugirió que, en comparación con el caso en el que se permitió que el ARNip contra GST- $\pi$  actuara individualmente sobre las líneas celulares de melanoma (SK-MEL-28 y A2058 que tienen una mutación en el gen BRAF) o el caso en el que se permitió que PLX4720 actuara sobre las líneas celulares de melanoma junto con siControl, el efecto supresor del crecimiento celular fue considerable en el caso en el que se permitió que el ARNip contra GST- $\pi$  y PLX4720 actuaran en combinación sobre tales líneas celulares de melanoma.

[Ejemplo 3]

En el presente ejemplo, se estudió el efecto supresor del crecimiento celular cuando se permitió que el fármaco que suprime GST- $\pi$  actuara sobre una célula que tiene una mutación en el gen BRAF y resistencia a un inhibidor de BRAF (célula resistente a inhibidor de BRAF).

<Recuento del número de células>

Se produjo la célula resistente a inhibidor de BRAF usada en el presente ejemplo de la siguiente manera. Se incubó la línea celular de melanoma A375 usada en el ejemplo 1 en medio DMEM que contenía antibiótico al que se le añadió de 1 a  $5 \mu\text{M}$  de PLX4720 (Selleck) y FBS al 15 % a  $37^\circ\text{C}$  bajo una atmósfera que contenía el 5 % de  $\text{CO}_2$  durante un mes. La línea celular que sobrevivió después de la incubación de 1 mes se determinó como células A375 resistentes a PLX4720 y se usó en el presente ejemplo.

En el presente ejemplo, el día antes de la transfección, se inoculó la célula A375 resistente a PLX4720 en una placa de histocultivo de plástico de 100 mm usando medio DMEM libre de antibiótico que contenía FBS al 15 % de modo que se lograron  $0,5 \times 10^6$  células/10 ml. Se añadieron 600 pmol de ARNip contra GST- $\pi$  (GGGAGGCAAGACCUUCAUUTT, ID de ARNip #2385, Ambion (SEQ ID NO: 3)) a 1 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I (GIBCO) y se agitaron suavemente. Posteriormente, se diluyeron  $35 \mu\text{l}$  de Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) con 1 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I (GIBCO) y se agitaron suavemente. Se agitaron suavemente el ARNip contra GST- $\pi$  diluido y Lipofectamine RNAi MAX diluido y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Mientras tanto, se reemplazó el medio con 10 ml de medio de suero reducido Opti-MEM I. Después de la incubación de 10 minutos, se añadió el complejo de ARNip contra GST- $\pi$  y Lipofectamine RNAi MAX a la célula y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  bajo una atmósfera que contenía el 5 % de  $\text{CO}_2$ . Después de la incubación de 5 horas, se reemplazó el medio con 10 ml de medio DMEM libre de antibiótico que contenía FBS al 15 %. Se lavó el medio con PBS 2 horas después del reemplazo, se desprendieron las células usando tripsina al 0,5 %-EDTA (SIGMA) y se suspendieron en medio DMEM que contenía antibiótico y FBS al 15 %. Se inocularon las células en suspensión en una placa de histocultivo de plástico de 60 mm de modo que se lograron  $1,0 \times 10^5$  células/5 ml. Se llevó a cabo la misma operación como experimentos de control usando ARNip al azar (CGAUUCGCUAGACCGGCUUCAUUGCAG, Hokkaido System Science Co., Ltd. (SEQ ID NO: 4)) o ARNip de control negativo AllStars (QIAGEN). Después de la transfección de ARNip contra GST- $\pi$ , se contó el número de células los días 0, 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

<Confirmación de la expresión de GST- $\pi$ >

Se confirmó la expresión de GST- $\pi$  mediante inmunotransferencia de tipo Western cuando se permitió que el ARNip contra GST- $\pi$  actuara sobre la célula A375 resistente a PLX4720 tal como se describió anteriormente. Más específicamente, usando las células recogidas en cada uno de los tiempos anteriores después de la transfección de ARNip contra GST- $\pi$ , se llevó a cabo el análisis por inmunotransferencia de tipo Western sobre la atenuación génica de GST- $\pi$ .

En primer lugar se lavaron las células recogidas con PBS fría, a las cuales se les añadió tampón de lisis frío (NP-40 al 1 %, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, complete Mini libre de EDTA (Roche) y PhosSTOP

(Roche)), se enfriaron con hielo y se incubaron durante 30 minutos para su solubilización. Se llevó a cabo la centrifugación a 4 °C, 15000 rpm durante 15 minutos, obteniéndose de ese modo un extracto celular. Se determinaron cuantitativamente las proteínas para el extracto celular obtenido usando el kit de ensayo de proteínas Micro BCA (Thermo SCIENTIFIC). A continuación, se desnaturalizan 20 µg del extracto celular en condiciones reductoras y se llevó a cabo SDS-PAGE usando MULTIGEL II mini 4/20 (13 W) (Cosmo Bio) para separar las proteínas. Después de completarse la SDS-PAGE, se transcribieron las proteínas a una membrana de PVDF usando un aparato de transferencia de tanque. Se incubó la membrana de transferencia en PBS con leche desnatada al 5 %/Tween 20 al 0,05 % (abreviado como PBS-T) a 4 °C durante 16 horas para llevar a cabo el bloqueo. Posteriormente, se hizo reaccionar la membrana con un anticuerpo anti-GST- $\pi$  (MBL) diluido con disolución de bloqueo de membrana (Invitrogen) a 4 °C durante 16 horas. Se llevó a cabo la reacción con anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1 hora usando un anticuerpo de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se llevó a cabo la detección de señales de banda sobre una película de rayos X mediante el método de quimioluminiscencia usando reactivos de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL (GE Healthcare). Se llevó a cabo lavado entre cada una de las operaciones mediante agitación durante 5 minutos, 4 veces usando PBS-T.

#### <Resultados>

En los últimos años, se entiende que la línea celular de melanoma que adquirió resistencia al inhibidor de BRAF está implicada en la recidiva de melanoma. Por consiguiente, se sometió GST- $\pi$  a atenuación génica usando células A375 resistentes a PLX4720 para investigar si GST- $\pi$  facilita la dependencia de CRAF en el melanoma resistente a inhibidor de BRAF. La medición del crecimiento celular reveló el notable efecto supresor del crecimiento (figura 5). Cuando se confirmó la atenuación génica de GST- $\pi$ , se suprimió la expresión de GST- $\pi$  el día 2 y el día 3 (figura 6).

El presente ejemplo sugiere que se suprimió eficazmente el crecimiento de células que tienen una mutación en el gen BRAF y resistencia a un inhibidor de BRAF (célula resistente a inhibidor de BRAF). Según los resultados, puede esperarse el efecto de prevenir o reducir enfermedades en las que la célula resistente a inhibidor de BRAF es un factor, por ejemplo, la recidiva de melanoma.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica para su uso en un método para la terapia de un cáncer provocado por un defecto de crecimiento de una célula cancerosa que tiene una mutación en un gen BRAF y resistencia a un inhibidor de BRAF, comprendiendo la composición farmacéutica un agente inductor de muerte celular o agente supresor del crecimiento celular para una célula que tiene una mutación en un gen BRAF, comprendiendo dicho agente un fármaco que suprime GST- $\pi$  como principio activo,
- 5
- 10 en la que el fármaco es una sustancia seleccionada del grupo que consiste en moléculas de iARN, ribozimas, ácidos nucleicos antisentido, polinucleótidos quiméricos de ADN/ARN y vectores que expresan al menos uno de los mismos.
2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la mutación es mutación V600E.
- 15 3. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el cáncer es un cáncer con alta expresión de GST- $\pi$ .
4. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el cáncer es cáncer colorrectal o melanoma.
- 20

Fig. 1

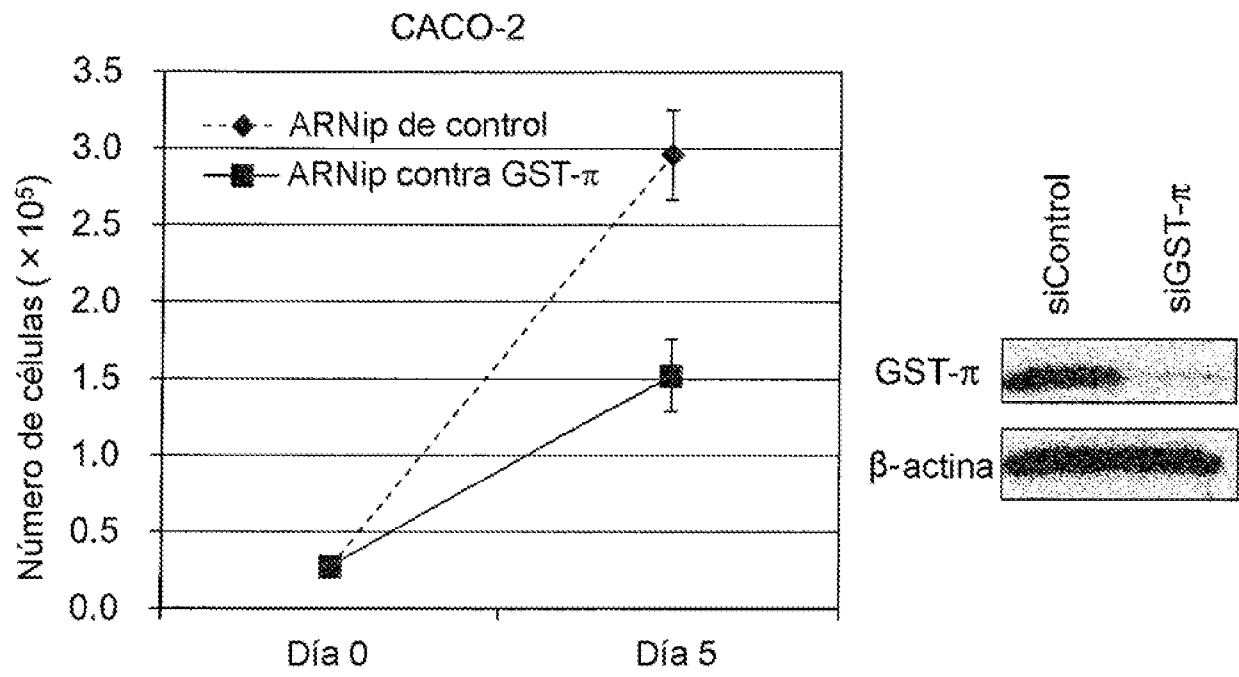


Fig. 2

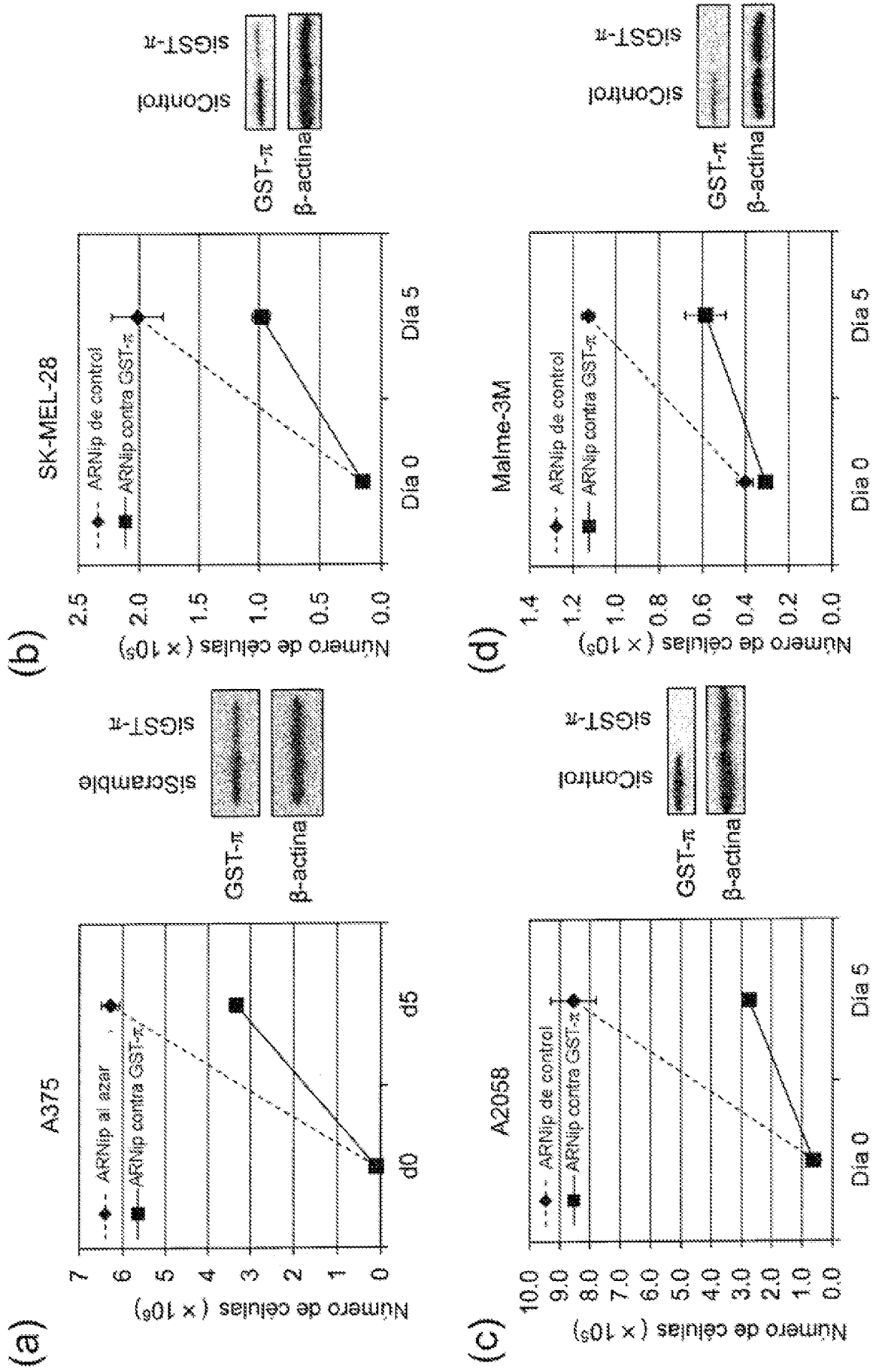


Fig. 3

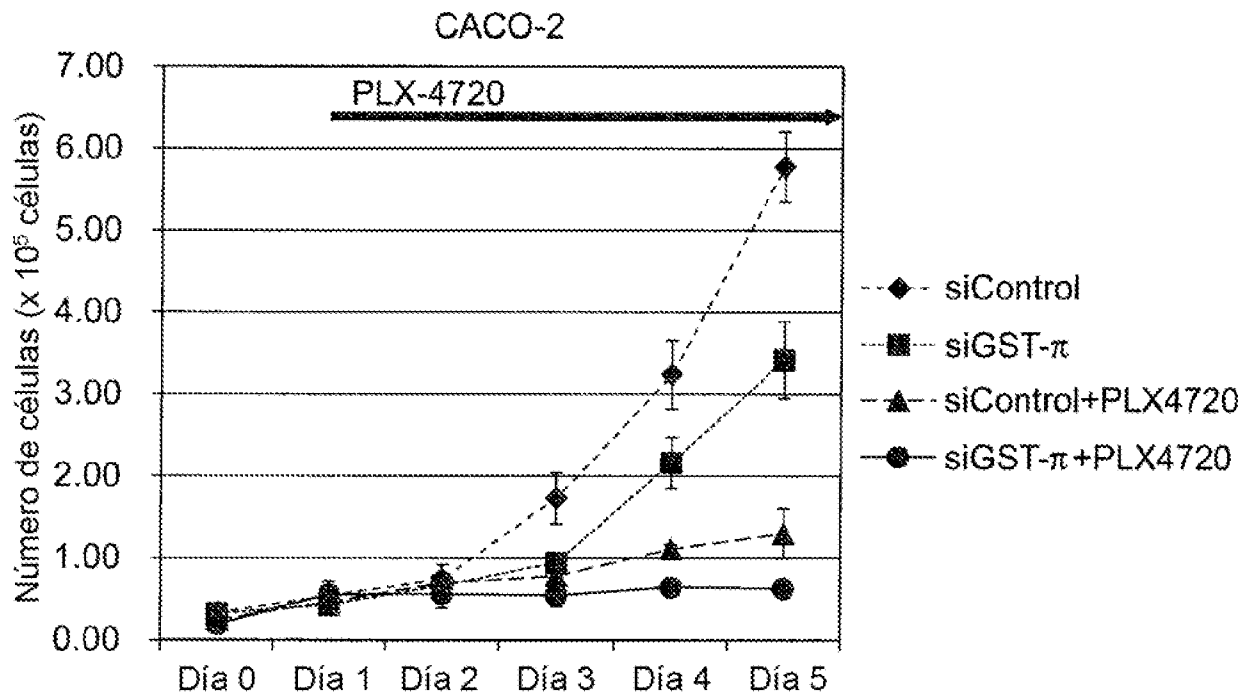
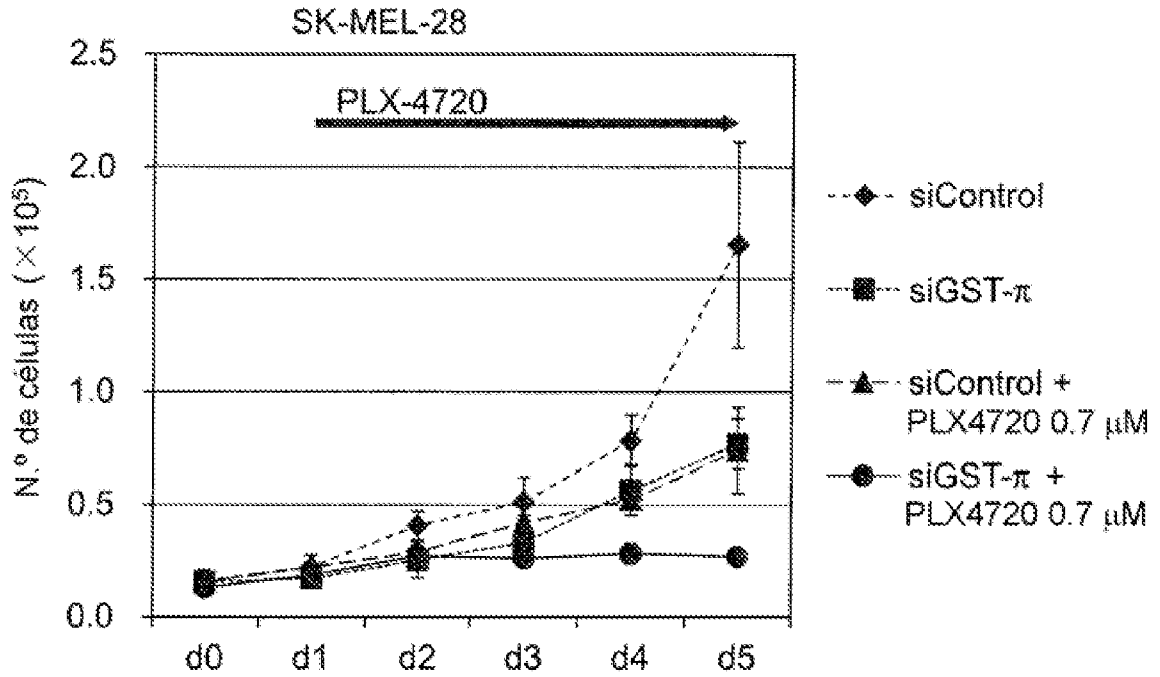


Fig. 4

(a)



(b)

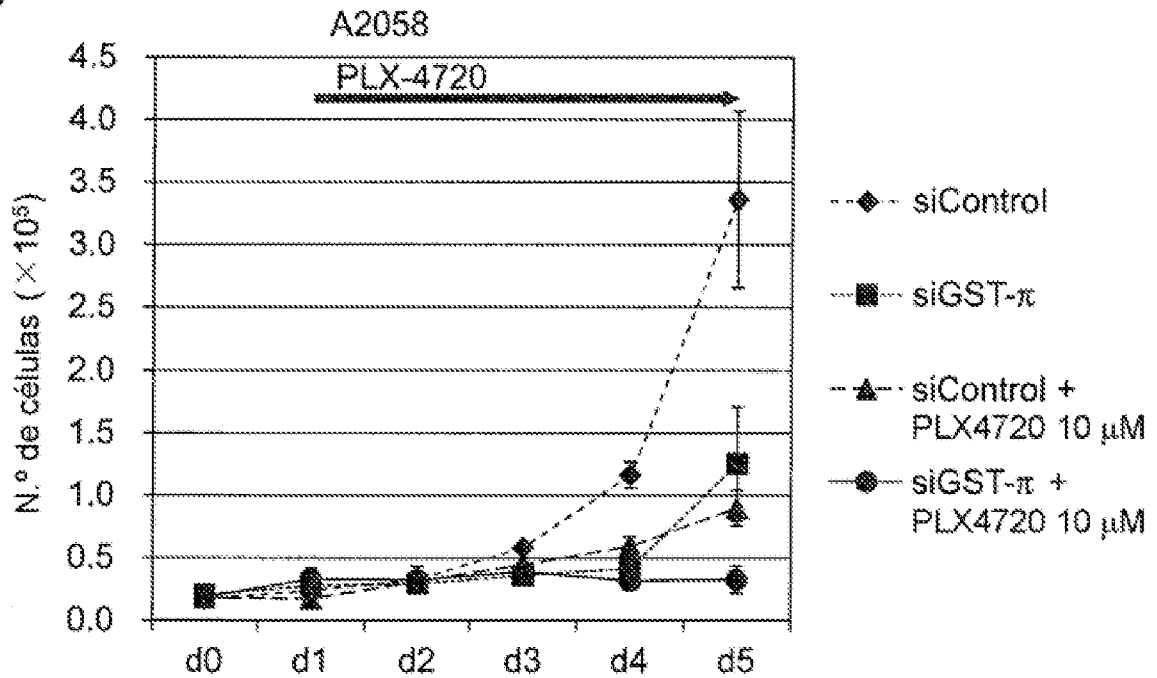


Fig. 5

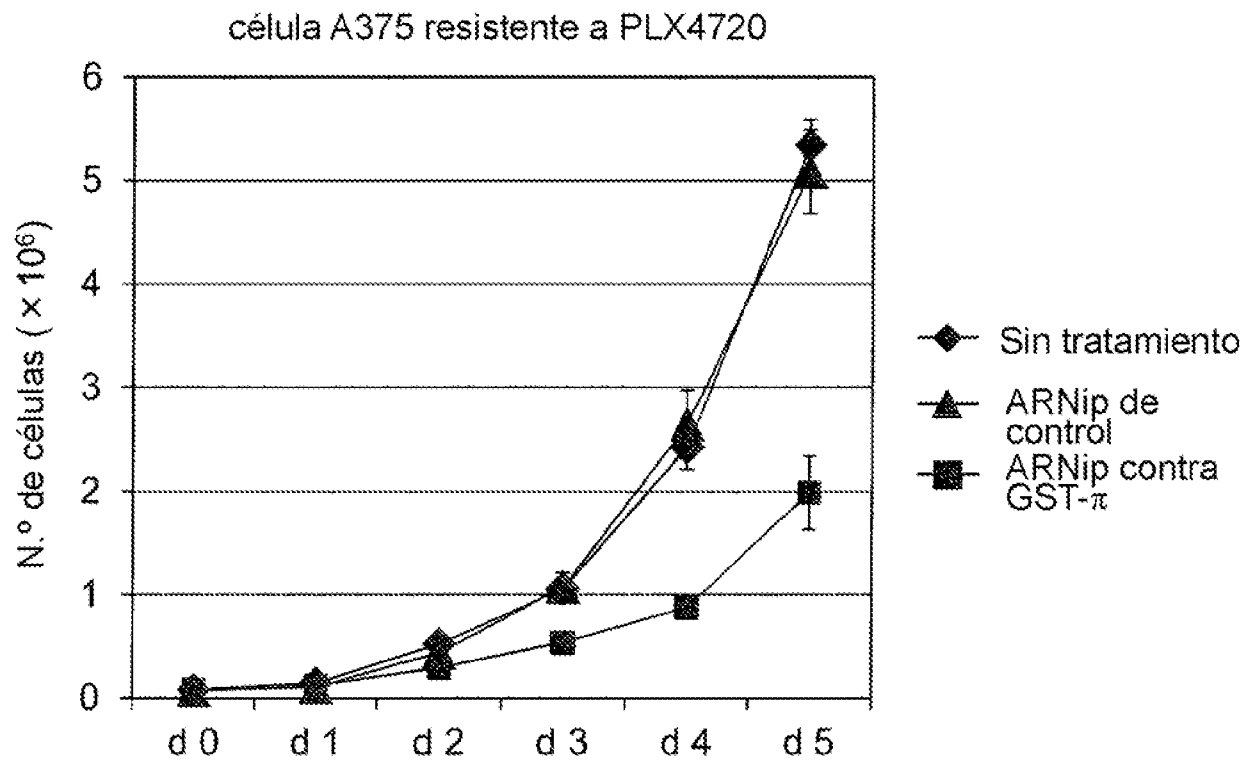


Fig. 6

