

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 769**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2009 E 17000026 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3182129**

54 Título: **Procedimiento de cribado de un agente terapéutico contra cáncer mutante K-Ras**

30 Prioridad:

21.11.2008 KR 20080116343
05.03.2009 KR 20090018956
17.08.2009 KR 20090075529
18.11.2009 KR 20090111710

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2019

73 Titular/es:

RAND BIO SCIENCE INC. (100.0%)
(Innobiz Park, Jeonmin-dong) 304 1646, Yuseong-
daero, Yuseong-gu
Daejeon 34054, KR

72 Inventor/es:

PARK, BUM JOON;
HA, NAM CHUL;
LEE, SUN HYE;
SONG, GYU YONG y
LEE, JEE HYUN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 715 769 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

Procedimiento de cribado de un agente terapéutico contra cáncer mutante K-Ras

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un compuesto que inhibe la unión de Snail-p53 para inducir la expresión de p53 de tal manera que se utilice eficazmente en el tratamiento de cáncer mutante K-Ras, como por ejemplo cáncer pancreático, cáncer de pulmón, colangioma y cáncer de colon y un agente terapéutico contra el cáncer que incluye el compuesto como componente eficaz.

Antecedentes en la técnica

10 La mejora de los fármacos y las herramientas de diagnóstico contra el cáncer ha elevado la tasa de supervivencia de 5 años en los pacientes de cáncer en términos globales hasta en un 50 %. Sin embargo, algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón y de páncreas, siguen presentando una tasa de supervivencia enormemente baja, de menos de un 10 %. En consecuencia, se necesita de forma urgente el desarrollo de procedimientos de diagnóstico tempranos para estos cánceres para aumentar las tasas de supervivencia de los pacientes de cáncer. Cabe destacar que, K-Ras es un evento predominante en dichos cánceres, en particular, en el cáncer de páncreas, 15 cuya tasa de supervivencia es un 5 % o menos.

Se sabe que Ras oncogénico induce la senescencia y apoptosis a través de la activación de p53 y se presupone que tiene lugar la formación de un tumor mediado por Ras oncogénico en un estado de deficiencia de p53, en particular, las células de cáncer inducidas por H-Ras son suprimidas por p53 rápidamente activado. Wei Guo y col., Cáncer Research, 2008, 68(18), 7403-7408 desvela la identificación de una molécula pequeña con letalidad de síntesis para K-Ras y proteína quinasa C iota. 20

Los fármacos de los que se dispone actualmente para el tratamiento de cáncer de pulmón y de páncreas tienen un efecto relativamente débil sobre la extensión del ciclo de vida y provocan varios efectos adversos. Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un fármaco para un tratamiento eficaz o un diagnóstico temprano de la enfermedad. 25

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

Los autores de la presente invención han observado que K-Ras oncogénico suprime p53 al inducir Snail, han identificado que un compuesto puede bloquear la interacción entre p53 y Snail y han observado que el compuesto induce la expresión de p53 en líneas de células mutantes K-Ras, por lo que han completado la presente invención. 30

La presente invención proporciona un procedimiento para cribar un agente terapéutico para cáncer mutante K-Ras, en el que el procedimiento incluye la identificación selectiva de un fármaco candidato para inhibir la unión Snail-p53, 35

Se describe asimismo un compuesto para inhibir la unión Snail-p53 y un agente terapéutico contra el cáncer que incluye el compuesto como componente eficaz.

Los autores de la presente invención han revelado que una región de p53 en particular, por ejemplo, un dominio de unión de ADN, tiene una creciente permeación en células mutantes K-Ras, y por tanto, p53 se puede utilizar como vehículo para suministrar el fármaco específicamente a las células mutantes K-Ras. Han observado que el cáncer mutante K-Ras, como por ejemplo cáncer de páncreas, pulmón, colangiocarcinoma y cáncer de colon, se puede diagnosticar de forma temprana detectando la expresión de anticuerpo Snail, por lo que han completado la presente invención. Se describe además un procedimiento de suministro de fármaco para suministrar el fármaco específicamente en las células mutantes K-Ras utilizando endocitosis de un dominio de unión de ADN de p53. 40

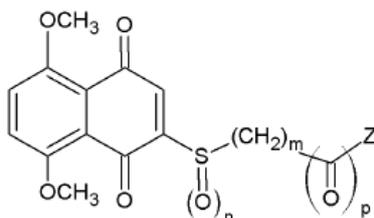
Se describe además un procedimiento para diagnosticar de forma temprana cáncer mutante K-Ras a través de la detección de la expresión de autoanticuerpo Snail.

Solución técnica

45 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para cribar un agente terapéutico para cáncer mutante K-Ras, en el que el procedimiento incluye el cultivo de Snail y un fármaco candidato sobre una placa sobre la cual se inmoviliza p53 y el cribado del fármaco candidato que inhibe la unión Snail-p53 utilizando un lector ELISA.

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un compuesto representado por la siguiente Fórmula 1, o una sal del mismo: 50

[Fórmula 1]



en la que, en la Fórmula 1,

m es un número entero de 0 a 10, n y p son cada uno de ellos 0 o 1,

5 Z se selecciona del grupo que consiste en $-\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, un grupo 4-fenilpiperidina, un grupo 4-fenilpiperacina un grupo isobutilamino y un grupo isobutiloxi, y q es un número entero de 0 a 9,

Por ejemplo, el compuesto se puede seleccionar del grupo que consiste en 2-nonilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona; 2-decilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona; ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxonaftalen-2-iltio)propanoico; ácido 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)undecanoico; 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidroinaftalen-2-iltio)-undecanoato de isobutilo; 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)-N-isobutilundecanamida; e 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-ilsulfinil) undecanoato de isobutilo, o una sal de los mismos.

El compuesto de Fórmula 1 permite el procedimiento de cribado de un agente terapéutico para cáncer mutante K-Ras para su uso para identificar selectivamente un fármaco para inhibir la unión Snail-p53, con lo cual se trata o previene eficazmente cáncer mutante K-Ras, cáncer de páncreas, pulmón y colon, que resultan difíciles de tratar y diagnosticar.

Efectos ventajosos

Un procedimiento de cribado de a un agente terapéutico para cáncer mutante K-Ras de acuerdo con la presente invención permite identificar específicamente un fármaco para inhibir la unión Snail-p53, con lo cual se puede tratar o prevenir eficazmente un cáncer mutante K-Ras, como cáncer de páncreas, pulmón, colangiocarcinoma, y colon, cuyo diagnóstico y tratamiento no es fácil.

Asimismo, se utiliza un dominio de unión de ADN de p53 como vehículo para suministrar el fármaco específicamente en células mutantes K-Ras, que es útil para el tratamiento de cáncer mutante K-Ras. Por otra parte, el cáncer mutante K-Ras puede diagnosticarse de manera temprana a través de la identificación de la expresión de autoanticuerpo Snail. Por lo tanto, es posible diagnosticar de forma temprana cáncer de páncreas cuyo diagnóstico es difícil, gracias a lo cual se aumenta la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer o de la eficiencia del tratamiento.

Descripción de los dibujos

Las Figuras 1 a 3, y 12 muestran mecanismos moleculares de la supresión de la expresión de p53 mediada por Snail.

FIG. 4 muestra que la supresión de p53 mediada por K-Ras oncogénico no se bloquea con un inhibidor químico.

FIG. 5 demuestra que Snail es un mediador crítico para la supresión de p53 mediada por K-Ras oncogénico.

FIG. 6 muestra una interacción directa entre Snail y p53.

FIG. 7 muestra las condiciones necesarias para activar ATR para estabilizar Snail inducida por K-Ras.

FIG. 8 muestra una unión directa entre Snail y p53.

FIG. 9 muestra la identificación de un inhibidor de unión Snail y p53.

Las Figuras 10 y 11 demuestran que la función de p53 se induce en células mutantes K-Ras a través del bloqueo de la unión de Snail y p53.

FIG. 13 muestra los resultados de un mecanismo de exportación de p53 desde un núcleo al citoplasma.

FIG. 14 muestra que p53 se secreta a través del transporte de vesícula.

FIG. 15 muestra los resultados de la eliminación de p53 mediante proteasa y por endocitosis y que Snail presenta resistencia a proteasa y endocitosis.

FIG. 16 muestra la reabsorción de His-p53 en células mutantes K-Ras.

FIG. 17 muestra la secreción de p53 y Snail en tejidos con cáncer.

FIG. 18 muestra los resultados del análisis de un anticuerpo anti-Snail en un suero de cáncer de pulmón.

FIG. 19 muestra una morfología de secreción esquemática de p53 y Snail en K-Ras oncogénico.

FIG. 20 muestra los resultados de un ensayo de transferencia de western para identificar la capacidad de inducción de compuestos sintetizados de acuerdo con los Ejemplos 1 a 5.

FIG. 21 muestra los resultados de un ensayo GST-desplegable para identificar el efecto de inhibición de unión Snail-p53 de Nutlina-3 y los compuestos 5o y 7a.

FIG. 22 muestra las tasas de apoptosis cuando se tratan líneas celulares de cáncer mutante K-Ras y líneas

celulares de cáncer K-Ras de tipo silvestre con los compuestos 5o y 7a y Nutlina-3.

FIG. 23 es un gráfico de los resultados del ensayo de transferencia de western en los que se induce la actividad de p21 por tratamiento con el compuesto 5o y Nutlina-3 en líneas celulares mutantes de p53.

FIG. 24 muestra una tasa de supervivencia de un ratón tratado con el compuesto 5o después de inyectar células A549 en un ratón atómico a través de una inyección intraperitoneal.

FIG. 25 muestra una imagen de tejido de un tumor generado por inyección intraperitoneal.

FIG. 26 muestra un hallazgo anormal anatómica global de acuerdo con el tratamiento con el compuesto 5o en células A549,

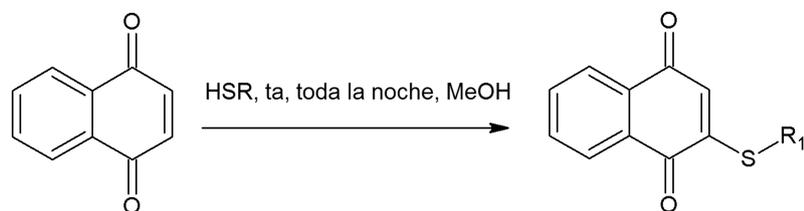
Mejor modo

10 De acuerdo con una realización, el compuesto de Fórmula 1 puede estar presente en forma de una sal. La sal puede ser una sal farmacéuticamente disponible de un ácido inorgánico, como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, o un ácido orgánico, como ácido p-toluen sulfónico.

El compuesto de Fórmula 1 puede prepararse a través de los Esquemas de reacción 1 a 5,

[Esquema de reacción 1]

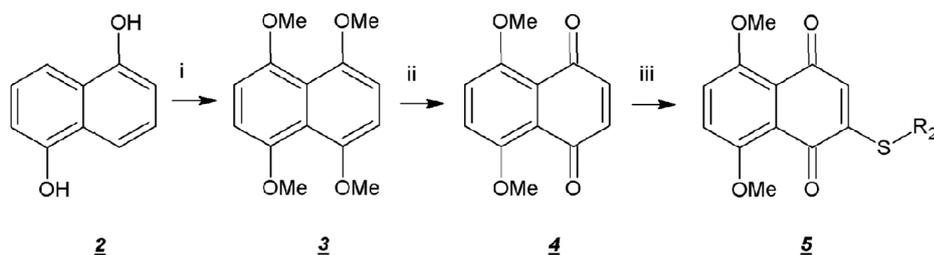
15



1

- 1-a: R₁ = -CH₃ 1-b: R₁ = -CH₂CH₃
- 1-c: R₁ = -(CH₂)₂CH₃ 1-d: R₁ = -(CH₂)₃CH₃
- 1-e: R₁ = -(CH₂)₄CH₃ 1-f: R₁ = -(CH₂)₅CH₃
- 1-g: R₁ = -(CH₂)₆CH₃ 1-h: R₁ = -(CH₂)₇CH₃
- 1-i: R₁ = -(CH₂)₈CH₃ 1-j: R₁ = -(CH₂)₉CH₃

[Esquema de reacción 2]



2

3

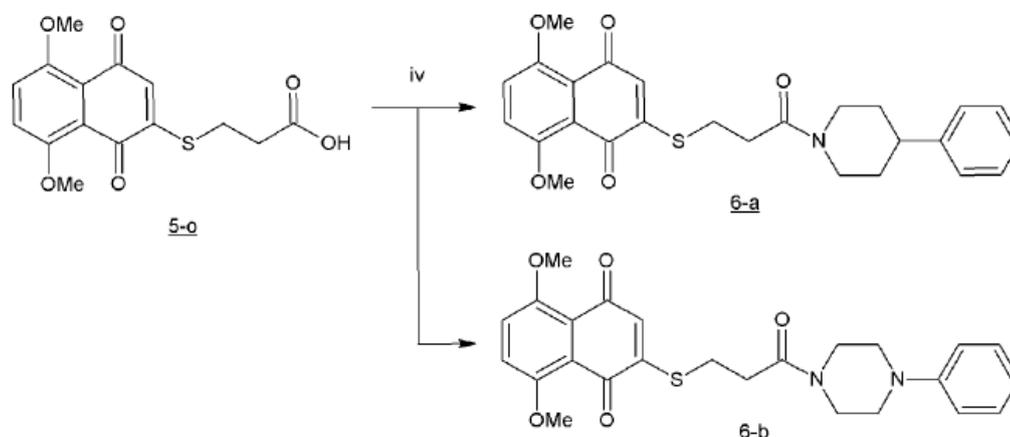
4

5

Condiciones de reacción: (i) Boletín de Sociedad Química de Japón 60(1), 205~13, 1987
 (ii) Boletín de Sociedad Química de Japón 61(6), 2039~45, 1988
 (iii) H₂NR o HSR, Na₂Cr₂O₇·H₂SO₄, ta, de 4 h a toda la noche, MeOH

- 5-a: R₂ = -NHCH₃ 5-b: R₂ = -NHCH₂CH₃
- 5-c: R₂ = -NH(CH₂)₂CH₃ 5-d: R₂ = -NH(CH₂)₃CH₃
- 5-e: R₂ = -NH(CH₂)₄CH₃ 5-f: R₂ = -NH(CH₂)₅CH₃
- 5-g: R₂ = -NH(CH₂)₆CH₃ 5-h: R₂ = -NH(CH₂)₇CH₃
- 5-i: R₂ = -NH(CH₂)₈CH₃ 5-j: R₂ = -NH(CH₂)₉CH₃
- 5-k: R₂ = -(CH₂)₂OH 5-l: R₂ = -(CH₂)₃OH
- 5-m: R₂ = -(CH₂)₄OH 5-n: R₂ = -(CH₂)₆OH
- 5-o: R₂ = -(CH₂)₂COOH 5-p: R₂ = -(CH₂)₁₀COOH

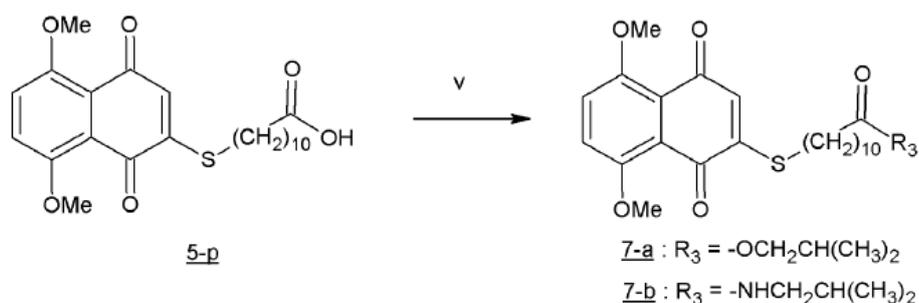
[Esquema de reacción 3]



Condiciones de reacción: (iv) EDC, 4-fenilpiperidina, temperatura ambiente, toda la noche, CHCl_3

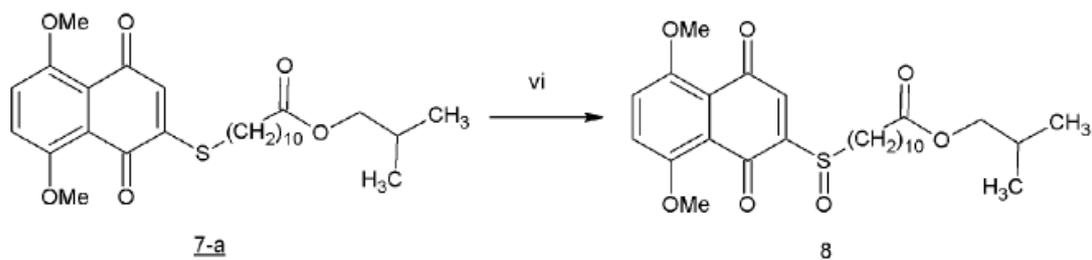
5

[Esquema de reacción 4]



Condiciones de reacción: (v) EDC, alcohol *i*-butílico o *i*-butilamina, temperatura ambiente, toda la noche, CHCl_3

[Esquema de reacción 5]



10 **Condiciones de reacción:** (vi) M-CPBA, temperatura ambiente, 2 h, CH_2Cl_2

A continuación, se describirá el Esquema de reacción 2 con detalle.

Se sintetiza 1,4,5,8-tetrametoxinaftaleno (3) a partir de 1,5-dihidroxinaftaleno (2) como material de partida a través de una reacción en tres fases conocida y, a continuación, se desmetila 1,4,5,8-tetrametoxinaftaleno (3) para producir 5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona(4) como producto de síntesis intermedio. En los Esquemas de reacción expuestos, se desvela un procedimiento de síntesis detallado y el disolvente utilizado en este punto puede ser un disolvente que no afecte negativamente a la reacción, y entre los ejemplos de dicho disolvente se incluyen hidróxido sódico, acetonitrilo, metanol anhidrido, *N,N*-dimetilformamida y cloroformo. Se realiza la metilación inicial de tal manera que se vierte sulfato de dimetilo en 1,5-dihidroxinaftaleno disuelto en hidróxido sódico en presencia de gas nitrógeno durante 1 hora y se lleva a cabo la reacción durante 2 horas. Se recristaliza el producto de reacción con benceno para producir 1,5-dimetoxinaftaleno.

20 Se prepara 1,4,5,8-tetrametoxinaftaleno (3) con metóxido sódico a reflujo térmico y cobre yodo en dimetilformamida y metanol en condiciones anhidras durante 30 horas. Se continúa el reflujo a una temperatura de reacción de 80 °C

o superior. Se sintetiza el producto intermedio 5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona utilizando cerio diamonio de ácido nítrico. Es decir se vierte cerio diamonio de ácido nítrico a temperatura ambiente durante 30 horas y se continúa con la reacción durante 30 minutos. Para preparar los compuestos 5a a 5p, se disuelve el producto intermedio 5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (4) en metanol y se añade la amina o mercaptano o un mercaptano que tiene un extremo al que se une un grupo carboxílico o un grupo hidroxilo y se agita a temperatura ambiente durante 4 horas durante toda la noche y se identifica el progreso de la reacción por TLC y se prepara la reacción utilizando ácido sulfúrico y solución acuosa de dicromato sódico y se aísla el producto de reacción por cromatografía de columna sobre gel de sílice.

Cuando se une un derivado de 4-fenilpiperidina o 4-fenilpiperacina a un grupo carboxílico en el sitio 2 del compuesto 5o en la siguiente etapa, se añade clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), en lugar de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP), para sintetizar los compuestos 6a y 6b, y en este caso. El rendimiento de reacción es alto y en un proceso de separación, se separa claramente el producto de reacción sin urea. En la siguiente etapa, cuando se alcohol isobutilico e isobutil amina utilizando el compuesto 5p, se puede obtener fácilmente los compuestos 7a y 7b que se obtienen utilizando clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC). Cuando se sintetiza el compuesto sulfóxido 8, se utilizan el compuesto 7a y MCPBA y se identifica el progreso de la reacción por TLC. Se prepara la reacción utilizando bicarbonato sódico y se pasa el producto de reacción a través de una columna sobre gel de sílice para obtener el compuesto 7a purificado.

Sin embargo, los procedimientos de acuerdo con los Esquemas de reacción 2 a 5 son únicamente un ejemplo de un procedimiento para preparar el compuesto de Fórmula 1. Por ejemplo, no están limitadas las condiciones de reacción, como puedan ser la cantidad del disolvente de reacción utilizada, la cantidad de la base utilizada y la cantidad del material utilizada, y es posible utilizar otros procedimientos de síntesis diferentes conocidos entre las personas expertas en la materia además de los procedimientos de acuerdo con los Esquemas de reacción 2 a 5, para preparar el compuesto de Fórmula 1.

Se describe con más detalle un agente terapéutico contra el cáncer que incluye un compuesto para inhibir la unión Snail-p53 como componente eficaz.

El compuesto puede ser un compuesto de Fórmula 1 o una sal del mismo, y preferentemente, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-nonilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona; 2-decilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona; ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-naftalen-2-iltio)propanoico; ácido 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-naftalen-2-iltio)undecanoico; 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)-undecanoato de isobutilo; 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)-*N*-isobutil undecanamida; y 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-ilsulfenil) undecanoato de isobutilo, o una sal de los mismos.

El cáncer puede ser cáncer mutante K-Ras. Por ejemplo, el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, colangioma y cáncer de colon.

El agente terapéutico contra cáncer puede incluir además un vehículo, un excipiente o un agente diluyente, siendo cada uno de ellos apropiado para su uso como agente terapéutico y utilizado convencionalmente en la preparación de una composición farmacéutica.

Entre los ejemplos de vehículo, excipiente y agente diluyente, que están disponibles para la presente invención se incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, amilo, caucho de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato de calcio, celulosa, metil celulosa, celulosa microcristalina, polivinilidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, estearato de magnesio y aceite mineral.

El agente terapéutico contra cáncer puede prepararse en una forma oral, como por ejemplo, polvo, un granulado, un comprimido, una cápsula, una suspensión, una emulsión, un jarabe o un aerosol, una formulación aplicable de forma externa, una formulación para supositorio o una solución inyectable estéril, de acuerdo con el procedimiento de preparación convencional correspondiente.

La preparación puede llevarse a cabo utilizando un agente diluyente o excipiente convencional, como por ejemplo un agente de carga, un expansor, un aglutinante, un agente humectante, un disgregante o un tensioactivo. Entre los ejemplos de formulación sólida para administración oral se incluyen comprimidos, píldoras, polvo, granulado y cápsulas y dichas formulaciones sólidas se preparan mezclando el compuesto tal como se ha descrito, con uno o más excipientes, como por ejemplo, amilo, carbonato cálcico, sacarosa o lactosa, o gelatina.

Asimismo, además de los excipientes, puede añadirse un lubricante, como estearato de magnesio o talco. Entre los ejemplos de formulación líquida para administración oral se incluye una suspensión, una preparación disuelta en líquido, una emulsión y un jarabe. La preparación líquida puede incluir, además de los agentes de dilución simples convencionales, como agua y parafina líquida, otros excipientes diversos entre los que se incluyen un agente de humectación, un edulcorante, un agente aromatizante y un conservante.

Entre los ejemplos de formulación para administración parenteral, se incluye una solución acuosa estéril, un disolvente no acuoso, una suspensión, una emulsión, una formulación para liofilización y una formulación para supositorio. Entre los ejemplos de disolventes no acuosos y suspensión se incluyen aceite vegetal, como propilen

glicol, polietilen glicol o aceite de oliva y un éster inyectable como oleato de etilo. Puede utilizarse como soporte para supositorios, witepsol, macrogol, tween 61, aceite de cacao, aceite de laurina o glicerogelatina.

5 La dosis del agente terapéutico contra el cáncer pueden diferir de acuerdo con la edad, el género o el peso del paciente, como por ejemplo, puede administrarse una dosis de 0,1 a 100 mg/kg como un bolo o dividido en varias porciones al día.

Por otra parte, la dosis del agente terapéutico contra el cáncer puede aumentarse o disminuirse de acuerdo con la ruta de administración, el grado en que esté avanzada la enfermedad, el género, el peso o la edad.

10 El agente terapéutico contra el cáncer puede administrarse a un mamífero, como ratas, ratones, ganado o seres humanos, a través de diversas rutas de administración. Todos los procedimientos de administración pueden ser evidentes, como por ejemplo, administración oral, administración rectal, o inyección intravenosa, intramuscular, hipodérmica, intrauterina, epidural o intracerebroventricular.

Asimismo, se describe con más detalle el procedimiento de suministro del fármaco específico de células mutantes K-Ras para suministrar el fármaco diana específicamente a células mutantes K-Ras por endocitosis de un dominio de unión de ADN de p53,

15 El dominio de unión de ADN incluye una secuencia de 90-280 de la secuencia de aminoácidos de p53 humano (Nº de acceso Genbank P04637).

Preferentemente, el procedimiento de suministro de fármaco puede incluir el tratamiento de células con un dominio de unión de ADN de p53 y un fármaco diana; y el suministro del fármaco diana a las células mutantes K-Ras adyacentes por endocitosis del dominio de unión de ADN de p53,

20 Asimismo, se describe con mayor detalle un procedimiento de diagnóstico temprano de un cáncer mutante K-Ras a través de la detección de la expresión del anticuerpo Snail.

La expresión de anticuerpo Snail puede detectarse en el suero de un paciente con cáncer mutante K-Ras, y el cáncer mutante K-Ras puede ser cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, colangioma y cáncer de colon.

25 **Modo de la invención**

A continuación, se describirán con detalle las realizaciones preferentes de la presente invención. Sin embargo, las realizaciones se presentan únicamente con fines ilustrativos.

[Mecanismo molecular de supresión de p53 mediada por Snail]

<Ejemplo 1>

30 1. Aislamiento e inmortalización de fibroblasto de ratón

Se sacrificó un ratón macho de 6 meses de vida para recoger fibroblasto. Tras el aislamiento del pulmón, se cortó el tejido y se disoció utilizando una malla de cultivo. Al cabo de tres días de incubación en medio DMEM que contenía FBS al 20 %, se sembraron las células unidas en platos de cultivo y se transfectaron con H-Ras, N-Ras y K-Ras mutante utilizando Jetpei siguiendo el protocolo del fabricante. Al cabo de 72 horas, se seleccionaron las células transfectadas utilizando 400 mg/ml de G418 que contenía DME.

35 2. Cultivo de células y preparación de reactivos

40 Las líneas celulares utilizadas en este punto fueron obtenidas de ATCC y se mantuvieron en RPMI_1640 o DMEM que contenía FBS al 10 %. Se adquirieron los anticuerpos utilizados en este punto de Santa Cruz o Cell Signalin (p53-R, p-Erk). El D. Chi SG y Hung M-C proporcionaron los vectores de expresión de Ras y los vectores Snail, respectivamente. Los productos químicos utilizado en este punto fueron adquiridos de Calbiochem. p53 recombinante fue obtenido de Assay Design.

Se llevó a cabo el análisis de fracción celular utilizando un kit de fracción Subcell (Merck) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para el análisis de los medios, se recogió un medio de cultivo de células y se concentró con Centricon (Millipore) o precipitación con EtOH.

45 3. Inmunotinción y transferencia de Western

50 Para la tinción celular, se lavaron las células cultivadas y se fijaron en Me-OH al 100 % y se incubaron con anticuerpos (primer anticuerpo: 1: 200 durante toda la noche a 4 °C; anticuerpo secundario: 1: 1000, 2 horas a temperatura ambiente). Para detectar p53 y Snail secretado, se transfectaron células HCT116 p53-/- con vectores durante 24 horas en 1 ml de medio PRMI 1640 y se fijaron añadiendo un 1 ml de PFA al 2 % sin lavado. Tras la fijación, se lavaron las células con PBS dos veces y se incubaron con tampón de bloqueo (PBS + anticuerpo anti-

humano (1: 500)) para eliminar la unión no específica. Después del lavado con PBS, se incubaron las células con anticuerpos anti-p53 y anti-Snail y se aparearon con el anticuerpo secundario. Para el análisis de proteínas, se extrajo proteína a través de tampón RIPA y se aplicó la muestra a SDS-PAGE de acuerdo con un protocolo de transferencia de western convencional.

- 5 Se llevó a cabo el análisis de inmuno-precipitación de acuerdo con un protocolo convencional. Es decir, se incubó el lisado celular primero con un anticuerpo durante 4 horas y después con proteína A/G – agarosa durante 2 horas. Se centrifugó el producto de incubación y se lavó 3 veces. Se sometió el complejo precipitado a análisis SDS-PAG/transferencia de western.

4. Transfección y revisión de efecto ARN-si

- 10 Para la transfección de células, se llevó a cabo JetPei de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se incubaron las células con una mezcla de ADN/JetPei durante 24 horas en un medio completo. Para la desactivación de gen *in vitro*, se prepararon ARN-si frente a Snail y MDM2, Se transfectó ARN-si utilizando JetPei y al cabo de 24 horas se comprobó el efecto.

5. Resultados experimentales

- 15 Tras como se muestra en la Fig. 1A, la transfección de N-Ras o HY-Ras indujo apoptosis o senescencia, en cambio las células transfectadas con K-Ras crecieron y se mantuvieron incluso a lo largo de 6 meses desde la transfección de K-Ras.

Asimismo, la expresión forzada de K-Ras oncogénico suprimió la expresión de p53 en líneas de células que contenían p53 de tipo silvestre (véase FIG. 2A), y a diferencia de H-Ras o N-Ras, K-Ras provocó la supresión, que no fue bloqueada por si-MDM2 (véase FIG. 2B). Sin embargo, K-Ras de tipo silvestre no suprimió la expresión de p53 (véase las Figuras 2C y 2D).

20 Tal como se muestra en FIG. 1B, se suprimió p53 de una manera dependiente de dosis de K-Ras. El bloqueo de la actividad de Ras A través de DN-Ras aumentó la expresión de p53 solamente en A549 mutado con K-Ras pero no en HepG2 (FIG. 2E).

25 Este resultado indica que K-Ras oncogénico endógeno suprime la expresión de p53, Sin embargo, tal como se muestra en la FIG. 1C, DN-Ras no presentó efectos evidentes y sinérgicos en la supresión de p53 mediada por lesión de ADN, lo cual implica que la fuerte tensión genotóxica superó la supresión de p53 mediada por K-Ras oncogénico.

30 Tal como se muestra en las FIG. 2F y 2G, se detectó la supresión de p53 mediada por K-Ras en mutante puntual. Sin embargo, p53 S46D, la forma activa de p53, presentó la resistencia a la supresión de p53 mediada por K-Ras. Este resultado está en consonancia con los resultados anteriores de que la activación de p53 inducida por genotoxina superó la supresión mediada por K-Ras.

35 Dado que el mutante 22/23 no se asocia con MDM2, se confirmó que la supresión de p53 mediada por K-Ras se consigue a través de una ruta independiente a MDM2. Asimismo, dado que los inhibidores de proteasoma no bloquean p53 mediada por K-Ras, este resultado demuestra la irrelevancia de MDM2 o el sistema de ubiquitina de p53 (véase las Figuras 1A y 2H).

Asimismo, se comprobó el efecto de los inhibidores de señalización MARK en la supresión de p53 mediada por K-Ras y se confirmó que el bloqueo de la ruta MARK no abolió el efecto de supresión de p53 mediada por K-Ras. Estos resultados implicaron que la supresión de p53 mediada por K-Ras se conseguiría a través de una ruta nueva.

40 Asimismo, se comprobó la distribución de p53 mediante Snail en una fracción insoluble y se observó que, tal como se muestra en FIG. 12A, p53 fue reducido por Snail o K-Ras oncogénico. Se dividieron las células en 4 fracciones, es decir, nucleares, citoplásmicas membrana/orgánulos y fracciones insolubles y se comprobó y se observó que, tal como se muestra en FIG. 12B, no se recuperó p53, reducido con Snail, en ningún tipo de fracción sub-celular.

45 Asimismo, la eliminación de Snail de células mutantes K-Ras indujo p53 más predominantemente que si-MDM2 (FIG. 12C). Y, tal como se muestra en las Figuras 12D y 12E, a diferencia de la supresión mediada por MDM2, la reducción de p53 mediante Snail no se recuperó con inhibidores de proteasoma.

<Ejemplo 2>

1. Transferencia de Western y ensayo de unión o quinasa *in vitro*.

50 Para abordar la unión directa entre Snail y p53, se cargó una membrana con p53 recombinante o Snail o lisado celular transfectado con p53 por SDS-PAGE típica y procedimiento de transferencia con gel. Tras el bloqueo con leche deshidratada sin grasa al 5 %, se incubó la membrana con lisado celular p53/HCT116 transfectado con p53 o Snail durante 4 horas a 4 °C. Después de lavado, se sometió la membrana a un procedimiento transferencia de western típico con anticuerpo p53 o anticuerpo Snail.

Para la unión *in vitro*, se incubaron p53 recombinante y GST-Snail alternativamente durante 1 hora a 4 °C y se llevó a cabo IP con anticuerpo p53 o anticuerpo GST y transferencia de western con GST o anticuerpo p53. Para examinar la modificación de Snail, se utilizaron 293 células para la transfección. Tras la fracción o lisis, se incubaron los lisados con GST o GST-Snail durante 1 hora a 25 °C y se sometieron a análisis SDS-PAGE y transferencia de western. Se obtuvieron anticuerpos contra sustrato p-MAPK y sustrato p-ATM/ATR de la señal celular.

2. Resultados experimentales

Tal como se muestra en FIG. 3A, se comprobó el efecto de K-Ras en la expresión de Snail y se observó que Snail había sido inducido por K-Ras. Asimismo, se comprobó el efecto de Snail en la expresión de p53 en líneas celulares y se observó que, tal como se muestra en FIG. 3B, la sobreexpresión de Snail suprimió p53 en líneas celulares A549 y HepG2, mientras que la desactivación de Snail indujo p53 solamente en A549 (línea celular que contenía K-Ras oncogénico) pero no HepG2.

Por otra parte, si-Snail aumentó la sensibilidad al agente de lesión de ADN (véase Fig. 4F). Por tanto, la sobreexpresión de Snail promovió la proliferación celular y produjo la resistencia a muerte celular inducida por lesión de ADN (véase Fig. 4G).

Tal como se muestra en la Fig. 3C, Snail también suprimió exo-p53, así como endo-p53, de manera similar a K-Ras (Figura 2C) y cuando se co-trasfectaron Snail y p53, tal como se muestra en las Figuras 3C y 3D, se redujeron juntos, a pesar del mutante p53. Sin embargo, los ARNm de Snail y p53 no se redujeron (Fig. 3C y 3D). Asimismo, se comprobó el efecto de Snail en el transcrito p53 y se observó que Snail no redujo ARNm de p53 (FIG. 4H).

Por consiguiente, estos resultados indican que aunque se había confirmado perfectamente p53 y Snail como reguladores transcripcionales, su reducción no tuvo relevancia con la regulación transcripcional. Por otra parte, la eliminación de Snail bloqueó la supresión de p53 mediada por K-Ras, tal como se muestra en las Figuras 3G y 3H. Asimismo, se obtuvieron resultados similares de exp-p53, Estos resultados indican que la supresión de p53 mediada por K-Ras se consigue a través de la inducción de Snail.

Asimismo, tal como se muestra en FIG. 5C, K-Ras oncogénico indujo p53 a las 4 horas, en cambio p53 se redujo al cabo de 6 horas. Este resultado indica que la supresión de p53 no se consiguió por transfección-artefacto, sino como un efecto de las proteínas transfectadas.

Asimismo, tal como se muestra en FIG. 5E, se comprobaron la apoptosis y el ciclo celular en células transfectadas con K-Ras/Snail y se observó que la apoptosis y la inhibición del ciclo celular no había sido inducida por K-Ras/Snail evidentemente.

Asimismo, se observó la reducción de p53 mediante K-Ras/Snail en células tratadas con afidicolina. Este resultado indicó que la reducción de p53 no estaba ligada al ciclo celular.

Asimismo, se comprobó el efecto de Snail en la semivida de p53 a través de la busca de pulsos CHX y se observó que, tal como se muestra en FIG. 5F, Snail no acortó la semivida de p53. Por otra parte, se comprobó el efecto de Snail en la expresión de p53 S46D y se observó que, tal como se muestra en FIG. 6A, a diferencia de K-Ras, Snail suprimió la expresión de p53 S46D.

Asimismo, se comprobó el efecto de p53 S46D sobre la expresión de Snail y se observó que, tal como se muestra en FIG. 6B, S46D suprimió la expresión de Snail a nivel de transcripción de y de traducción. Por consiguiente, a diferencia de p53 de tipo silvestre en el que si-Snail restauró la supresión de p53, tal como se muestra en FIG. 6C, si-Snail no indujo la expresión de p53 cuando se transfectó S46D.

Estos resultados indican que en ciertas condiciones de tensión, p53 activado por modificación en el radical 46 serina puede superar la supresión mediada por K-Ras.

Asimismo, se consiguió la inducción de Snail a través de ATR.

Para abordar cómo K-Ras induce Snail, se examinó el compromiso de AKT. Se sabe que Ras activa AKT para suprimir la desestabilización de Snail mediada por GSK-3,

Pero AKT-KD no bloqueó la supresión de p53 inducida por Snail o K-Ras, tal como se muestra en FIG. 7A. Por el contrario, la supresión de ATR a través de si-ARN bloqueó la supresión de p53, tal como se muestra en FIG. 7B. De hecho, Snail aumentó con ATR pero no con ATM y tratamiento con nocodazol, tal como se muestra en las Figuras 7C y 7D. El ensayo de quinasa *in vitro* demostró que Snail se fosforiló mediante ATR, tal como se muestra en FIG. 6D. K-Ras, conocido por activar ATR, también aumentó p-Snail de manera dependiente de ATR, tal como se muestra en FIG. 7E y extendió la semivida de Snail.

<Ejemplo 3>

1. Proteínas recombinantes y análisis GAT desplegable

Se expresaron tres fragmentos Snail humanos (restos 1 - 90, 91 - 112, y 113 - 264) y fragmentos p53 (1-93 y 93-292) en *Escherichia coli* (*E.coli*) como proteína de fusión GST. Se cargó cada uno de los fragmentos sobre GSH-agarosa, se lavó y después se diluyó utilizando un tampón que contenía 20 mM de glutatona reducida. Asimismo, se purificaron las fracciones eluidas utilizando cromatografía de intercambio de aniones (HitrapQ). Se expresó la proteína p53 humana recombinante (restos 94 292) en *E. coli* utilizando un vector pET28A que contiene una etiqueta hexa-histidina en el término C.

Se purificó la proteína p53 utilizando cromatografía de exclusión de tamaño y afinidad de Ni-NTA (Superdex 200). Para identificar una unión directa entre p53 y Snail, se incubaron perlas de agarosa conjugadas con GST o GST-Snail con lisado celular o His-p53 en RIPA durante 45 minutos a 4 °C. Después de lavado con PBS y RIPA, se sometió la proteína precipitada a SDS PAGE y transferencia de western.

2. Resultados experimentales

Dado que Snail es una proteína nuclear, p53 desapareció cuando fueron transfectadas (véase las Figuras 3D a 3F). Tal como se muestra en FIG. 8A, se confirmó por la endo-IP que estas proteínas estaban asociadas entre sí. Tal como se muestra en las Figuras 8B y 8C, el análisis de transferencia Far-Western y el ensayo GST-desplegable indicaron que Snail y p53 habían interactuado directamente entre sí. Asimismo, un dominio de unión de ADN de p53 y una región media de Snail actuaron como un dominio de unión (véase las Figuras 8D a 8F, 6E, y 6F.)

<Ejemplo 4>

1. Preparación de sistema ELISA para cribado químico

Para aislar un inhibidor de unión Snail-p53, se preparó un sistema ELISA. Se inmovilizó His-p53 (93-292) en placas de 96 pocillos utilizando 0,5 % PFA. Después del secado y el lavado, se incubaron las placas de 96 pocillos con GST Snail con 0,1 mM de productos químicos (concentración final). Al cabo de 1 hora de incubación, se lavaron las placas de 96 pocillos con TBST y se incubaron con anticuerpo anti-GST (1: 10000, 45 minutos) y IgG-HRP anti-ratón (1: 50000, 30 minutos. Después del doble lavado, se incubaron las placas con una solución TMB y una solución de parada. Se llevó a cabo la medición utilizando un aparato de lectura ELISA.

2. Resultados experimentales

Tal como se muestra en las Figuras 9A y 9B, se comprobó la inhibición de unión de p53 y Snail a través de un sistema ELISA. Tal como se muestra en la FIG. 9C, se identificaron aproximadamente 150 productos químicos, se identificaron 3 tipos de productos químicos como inhibidor de la unión de Snail y p53, Tal como se muestra en las Figuras 10A y 11A, estos productos químicos demostraron la inhibición de la unión de Snail y p53 dependiente de dosis.

A través del ensayo GST-desplegable, se midió la expresión de p53 y sus dianas tras el tratamiento de estos productos químicos y se observó que todos ellos bloqueaban la interacción de p53 y Snail e indujeron la expresión de p53 (véase las Figuras 8B y 11B).

Asimismo, se observó la inducción de PUMA y p21 mediante el tratamiento con estos productos químicos. En particular, se detectó la inducción de p53 solamente en células K-Ras mutadas, pero no en células albergadoras K-Ras de tipo silvestre (véase FIG. 10D). La estructura similar de quercetina y morina indicó que el sistema de cribado era fiable (véase FIG. 10E).

Asimismo, se comprobó el efecto de productos químicos en la supresión de p53 mediada por Snail. Tal como se muestra en las Figuras 10E y 10F, se bloqueó la reducción de p53 por co-transfección de Snail por tratamiento con productos químicos con N° 3 y N° 9. Estos resultados indican que el bloqueo de la interacción p53-Snail restauró la expresión de p53.

Asimismo, se examinó el efecto de estos productos químicos en la proliferación celular utilizando tinción de azul de trifano. Se observó que estos productos químicos suprimieron evidentemente la proliferación celular en A549, mientras que no presentaron ningún efecto anti-proliferación en MKN45 (véase FIG. 11C).

Asimismo, el ácido ferúlico provocó la muerte celular en células K-Ras mutadas (véase FIG. 11D). Además, quercetina (N° 2) fue identificado como un inhibidor de la interacción Snail-p53.

[Procedimiento de suministro de fármaco específico de células mutantes K-Ras utilizando endocitosis de dominio de unión de ADN de p53]

<Ejemplo 5>

1. Mecanismo de exportación de p53 desde el núcleo al citoplasma

Para llevar a cabo un ensayo GST-desplegable, primero se preparó proteína recombinante p53 y Snail humana utilizando un procedimiento conocido (Neoplasia 11: 22-31, 2009). Para identificar una unión directa entre p53 y

Snail en medios y lisado celular entero, se incubaron perlas de agarosa conjugadas con GST o GST-Snail con el lisado celular o medios de cultivo a 4 °C durante 2 horas.

Después de lavado con PBS y RIPA, se sometió la proteína precipitada a SDS PAGE y transferencia de Western aplicando el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente.

5 **2. Resultados de los experimentos**

Se comprobó el efecto de Snail en p53 NES que está mutado en una secuencia de exportación nuclear de p53 desde el núcleo al citoplasma y se observó que Snail redujo la expresión de p53 (véase FIG. 13A) y leptomicina B(LMB; bloqueador de exportación nuclear de un núcleo a un citoplasma) no bloqueó la reducción de p53 mediada por Snail (véase las Figuras 13B y 13C). Se confirmó la reducción de p53 mediante Snail en tiempo real (véase FIG. 13D). Se comprobó la expresión de p53 en medios de cultivo y al cabo de 2 horas, se detectó la expresión de p53 en los medios (véase FIG. 13E). Asimismo, se detectó p53 en citosol como una estructura de tipo vesícula en células transfectadas con Snail o K-Ras y, finalmente, se detectó en una región extracelular (véase FIG. 13F). Al mismo tiempo, se localizó Snail en la vesícula de citosol con p53 (véase FIG. 17A).

Para confirmar la secreción de p53 en células K-Ras mutadas, se llevó a cabo el ensayo GST-desplegable utilizando Snail-GST en medios de cultivo y lisados celulares. Se confirmó que aunque se detectó p53 asociado con Snail en todos los lisados celulares, la mediana de p53 se observó únicamente en K-Ras mutado de las líneas de células de cáncer de páncreas (véase FIG. 13G). Asimismo, se identificó la mediana p53 en medios de cultivo de células K-Ras mutadas, sin Snail-desplegable (véase FIG. 13H).

Dado que p53 se reduce por el transporte de tipo vesícula, se comprobó la expresión de p53 por interrupción de la red de citoesqueleto con Nocodazol (Noc.). Se observó que el tratamiento con Noc bloqueó la reducción de p53 mediada por Snail o K-Ras (véase FIG. 14A), a pesar de la tinción de tipo vesícula citoplásmica de p53 en células tratadas con Noc, la morfología celular cambió diferenciadamente de las células de control (véase FIG. 14B). Noc bloqueó la reducción de p53 (véase FIG. 14C). La mediana de p53 desapareció con el tratamiento con Noc, mientras que p53 se acumuló en el citoplasma como vesícula (véase las Figuras 14D y 14E). Aph/Noc bloqueó la reducción de p53, que no se consiguió con LMB (Figuras 14F y 14G).

<Ejemplo 6>

1. Comportamiento de p53 y Snail extracelulares

1) Análisis de tejido

Se obtuvieron tejidos normal y de tumor colangioma e hígado emparejados del centro médico Shunchunhyang. Se congelaron rápidamente los tejidos en un congelador profundo antes de su uso. Se cortaron los tejidos congelados, y se incubaron 0,5 mg de tejidos en 0,25 ml de medio desprovisto de suero durante 30 minutos a 37 °C para permitir la liberación del fluido del tejido. Después de la incubación, se recogió el medio de cultivo y se hizo precipitar con 0,5 ml de Et-OH al 100 %. Se disolvieron los materiales precipitados utilizando RPA y se utilizaron para análisis SDS-PAGE y transferencia de western. Asimismo se obtuvo el mismo medio de cultivo a través del mismo procedimiento y se utilizó el medio de cultivo para detectar anticuerpo p53.

2) Ensayo Elisa de p53

Para examinar el p53, se llevó a cabo ELISA siguiendo el protocolo del fabricante (Assay Design). Brevemente, se agregaron 0,2 ml de medio de cultivo de tejido a pocillos y se incubó con anticuerpo de detección. Tras el lavado con tampón de lavado, se añadieron 0,2 ml de sol de sustrato y 0,05 ml de solución de parada.

3) Detección de anticuerpo Snail en muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre humana de la universidad de Shunchunhyang (pacientes de cáncer de páncreas y cálculos biliares), y el centro médico de la universidad nacional de Pusan (cáncer de pulmón). Se recogieron muestras de sangre normales de voluntarios o de pacientes que no tenían cáncer. Se recogió suero por centrifugación y se mantuvo a -70 °C hasta su uso. Se incubaron 3 µl de suero con GST-Snail-N conjugado con agarosa tras el pre-aclarado con proteína GST. Se disolvió el complejo GST-Snail-anticuerpo precipitado con RIPA y tampón de muestra SDS y se sometió a SDS-PAGE siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito. Después de la transferencia a una membrana PVDF, se incubó la proteína con anticuerpo anti-humano y anticuerpo anti-GST.

2. Resultados del experimento

En primer lugar, se trataron células A549 y MKN 45 con p53 recombinante y se identificaron sus emplazamientos. En comparación con la proteína de control (His-lamina A) recuperada del medio, se expresó His-p53 en lisado de célula completa de A549 (FIG. 15A). Por otra parte, se separó completamente His-p53 de células MKN45 y el medio de cultivo de las mismas (FIG. 15A).

Para obtener más detalles, en la presente invención, se cultivó p53 recombinante utilizando medios nuevos, medio de cultivo A549-, PC3, y HCT116. En comparación con His-lamina A recuperada del medio, se detectó p53-His en el

lisado de célula completa HCT116. Por otra parte, no se recuperó p53 ni del medio de cultivo A549 ni de PC3. Estos resultados indican que p53 fue digerido por proteasa secretada de las células cultivadas y también reabsorbido por células K-Ras mutadas.

5 Asimismo, el inhibidor de proteasa (PMSF) y el inhibidor de endocitosis (Brefeldin A; BFA) fueron tratados en A549 y Capan-1, a pesar de que no hubo ningún efecto en la expresión de p53 intracelular, ambos productos químicos aumentaron la expresión de la mediana de p53 (véase FIG. 15B). BFA bloqueó la localización de p53 recombinante en lisado de célula completa A549 (FIG. 15C).

10 Para conocer el comportamiento de Snail secretado, se llevó a cabo el tratamiento con Snail recombinante y se comparó el destino de p53. Se recuperó la región central de p53 de WCL de A549, que fue suprimida con BFA. Aunque recombinante p53 tratado en MKN 45 desapareció en el medio y en WCL. Estos resultados indican que p53 secretado podría ser digerido no solamente por serina proteasa sino también por otros tipos de proteasas como MMP. Al mismo tiempo, se recuperó Snail del medio y se recuperó Snail recombinante sin inhibidor de proteasa. Estos resultados indicaron que Snail podría ser resistente a endocitosis, así como digestión mediada por proteasa.

15 Se midió el efecto de K-Ras sobre la endocitosis de p53 y se observó que p53 recombinante era eliminado selectivamente por células transfectadas con K-Ras. Si la región central de p53 pudiera volver a entrar en células K-Ras mutadas esta propiedad sería útil para el suministro químico de células K-Ras mutadas.

Para confirmarlo, se trataron con PI (yoduro de propidio; colorante rojo, 50 mg/ml) e His-p53 (2 mg/ml) en A549 y MKN 45, PI en solitario no se acumuló en las células interiores de A549 (Figuras 15E, y 16A a 16B). Estos resultados indicaron que p53 podría ser útil para el sistema de suministro de fármaco específico de K-Ras.

20 Para confirmar si el autoanticuerpo de p53 es producido por P53 secretado mediado por Snail, se identificó la expresión de p53 y Snail en fluido de tejido. Se detectaron p53 y Snail en colangioma, pero no en carcinoma hepatocelular (HCC) y en fluido de tejido sin cáncer (véase las Figuras 17A y 17B). Tal como se muestra en FIG. 17C, se examinó la presencia de p53 en fluido de tejido utilizando ELISA. Se observó que el anticuerpo anti-p53 y el anticuerpo anti-Snail fueron detectados en colangioma, pero no en HCC (véase las Figuras 17D y 17E). Por otra parte, se examinó el autoanticuerpo contra p53 y Snail en el suero sanguíneo de pacientes de cáncer de páncreas o
25 cáncer del conducto biliar y se confirmó que el anticuerpo anti-p53 no presentó relevancia para el cáncer. Estos resultados indican que el autoanticuerpo p53 no presentó relevancia con el estado del cáncer y p53 secretado fue eliminado rápidamente mediante proteasa y endocitosis (véase FIG. 15A).

[Tabla 1]

Nº de muestra	Edad	Sexo	Etapas	Diagnóstico	p53 suero	Snail suero	Anticuerpo anti p53	anticuerpo antiSnail
1	45	F	IV	CBD cáncer/adenocarcinoma	Y	Y	Y	Y
2	78	F	III	CBD cáncer/adenocarcinoma	Y	Y	Y	Y
3	58	M	IIB	adenocarcinoma (colangiocarcinoma intrahepático)	Y	Y	Y	Y
4	74	M	IIA	CBD cáncer/adenocarcinoma	Y	Y	Y	Y
5	62	M	IIB	adenocarcinoma vesícula biliar	Y	Y	Y	Y
6	38	M	IIA	CBD cáncer/adenocarcinoma	Y	Y	Y	Y
7	56	F	IIB	adenocarcinoma (colangiocarcinoma intrahepático)	Y	Y	Y	Y
8	59	M	IIA	CBD cáncer/adenocarcinoma	Y	Y	Y	Y
9	68	M	IB	Adenocarcinoma de ampolla de Vater	Y(débil)	N	N	Y
10	54	F	IIB	CBD cáncer/adenocarcinoma	Y	Y	N	N
HCC								
1	58	M	II	HCC	N	N	N	N

(continuación)

Nº de muestra	Edad	Sexo	Etapa	Diagnóstico	p53 suero	Snail suero	Anticuerpo anti p53	anticuerpo antiSnail
2	43	M	I	HCC	N	N	N	Y(débil)
3	66	M	III	HCC	N	N	N	Y(débil)
4	63	F	I	HCC	N	N	N	N

5 En contraste, Snail fue resistente a proteasa y endocitosis (FIG. 15D). Por tanto, se comprobó el autoanticuerpo Snail en suero. Se detectó la expresión de anticuerpo Snail en el suero de pacientes con cáncer de páncreas y en el suero de pacientes con cálculos biliares (véase FIG. 15F). En contraste, no se detectó anticuerpo Snail en población sana normal (véase FIG. 15G). Se detectó anticuerpo Snail en el suero de pacientes con cáncer de pulmón (FIG. 18). Por consiguiente, se consideró que la presencia de anticuerpo Snail podría ser muy útil como marcador de diagnóstico de cáncer.

[Tabla 2]

Nº	sexo/edad	tipo célula	TNM	Estadio	meta		Anticuerpo Snail
1	M/64	ADC	T2N0M0	IB	x		
2	M/65	ADC	T4N3M1	IV	cerebro	perdido en f/u	positivo
3	M/73	SQC	T4N3M1	IV	pulmón		
4	M/68	SQC	T4N2Mx	IIIB	¿		positivo
5	M/63	SQC	T4N2Mx	IIIB	¿		
6	M/50	ADC	T4N3M1	IV	cerebro, hueso		
7	M/72	SQC	T4N2M1	IV	cerebro		positivo
8	M/66	SQC	T4N3Mx	IIIB	¿		
9	M/65	SQC	T2N2Mx	IIIA	¿	N/A	positivo
10	M/56	SQC	T2N1Mx	IIB	¿	N/A	positivo
11	M/72	SQC	T4N2Mx	IV	hueso	perdido en f/u	
12	M/58	SQC	T2N3M0	IIIB	x	expira	
13	M/72	ADC	T1N3M0	IIIA	x		
14	M/80	ADC	T4N3M1	IV	hueso		
15	M/71	SQC	T3N2M1	IV	pulmón	expira	positivo
16	F/74	SCLC		extensivo	pulmón	expira	
17	M/62	SQC	T4N3M1	IV	pulmón		
18	M/48	Sin cáncer					
19	M/73	SQC	T2N1Mx	IIB	¿	NA	positivo
20	M/63	SQC	T4N3M0	IIIB	x	expira	positivo
21	F/64	ADC	T4N3M1	IV	pulmón	NA	positivo
22	M/69	SQC	T4N3Mx	IIIB	¿		positivo
23	M/80	SQC	T4N2M1	IIIB	¿		
24	F/47	ADC	T4N2M1	IV	pulmón	perdido para f/u	
25	M/61	SQC	T2N3M0	IIIB	x	expira	positivo
26	M/63	SQC	T2N3Mx	IIIB	¿		positivo
27	F/65	SCLC		limitado	x		positivo
28	M/62	SQC	T3N3Mx	IIIB	¿	NA	positivo
29	M/67	ADC	T4N3Mx	IIIB	¿		positivo
30	F/53	ADC	T1N0M0	IA	-		positivo

[Identificación de inhibidor de unión Snail-p53]**<Ejemplo 1>**1-1. Síntesis de 2-metiltio-1,4-naftoquinona (1a)

Se disolvieron 0,617 mM de 1,4-naftoquinona en 30 ml de metanol en un matraz redondo de una boca de 100 ml y se agregaron 1,54 mM trimetóxido sódico y se agitó durante toda la noche. Se agregaron 50 ml de solución saturada de cloruro sódico a la mezcla de reacción, seguido de extracción tres veces con 50 ml de cloroformo y se deshidrató una capa orgánica con sulfato sódico anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida y se recristalizó el residuo obtenido con metanol para producir 2-metiltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo.

Rendimiento: 14,0 %, Punto de fusión: 185-186 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,12-8,07 (m, 2H), 7,78-7,70 (m, 2H), 6,58 (s, 1H), 2,40(s, 3H), *m/z* 205,1 (M+H)+.

1-2. Síntesis de 2-etiltio-1,4-naftoquinona (1b)

Se preparó 2-etiltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó etilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 40,7 %, Punto de fusión: 135-136 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,12-8,08 (m, 2H), 7,78-7,69 (m, H), 6,62 (s, 1H), 2,87 (q, *J*=7,2Hz, 2H), 1,44 (t, *J*=7,2Hz, 3H), *m/z* 219,1 (M+H)+.

1-3. Síntesis de 2-propiletio-1,4-naftoquinona (1c)

Se preparó 2-propiltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó propilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 33,9 %, Punto de fusión: 118-119 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,12-8,07 (m, 2H), 7,77-7,68 (m, 2H), 6,61 (s, 1H), 2,82 (t, *J*=7,6Hz, 2H), 1,86-1,77 (m, 2H), 1,11 (t, *J*=7,2Hz, 3H), *m/z* 233,0 (M+H)+.

1-4. Síntesis de 2-butiltio-1,4-naftoquinona (1d)

Se preparó 2-butiltio-1,4-naftoquinona (1d) que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó butilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 33,9 %, Punto de fusión: 97-98 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,12-8,07 (m, 2H), 7,77-7,68 (m, 2H), 6,61(s, 1H), 2,84 (t, *J*=7,2Hz, 2H), 1,80-1,72 (m, 2H), 1,57-1,48 (m, 2H), 0,98 (t, *J*=7,6Hz, 3H), *m/z* 247,1 (M+H)+.

1-5. Síntesis de 2-pentiltio-1,4-naftoquinona (1e)

Se preparó 2-pentiltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó pentilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 15,3 %, Punto de fusión: 111-112 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,11-8,06 (m, 2H), 7,77-7,68 (m, 2H), 6,60 (s, 1H), 2,83 (t, *J*=7,6Hz, 2H), 2,17-1,74 (m, 2H), 1,51-1,33 (m, 4H), 0,93 (t, *J*=7,2Hz, 3H), *m/z* 261,2 (M+H)+.

1-6. Síntesis de 2-hexiltio-1,4-naftoquinona (1e)

Se preparó 2-hexiltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó hexilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 15,0 %, Punto de fusión: 101-102 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,13-8,08 (m, 2H), 7,77-7,69 (m, 2H), 6,61 (s, 1H), 2,83 (t, *J*=7,6Hz, 2H), 1,81-1,73 (m, 2H), 1,56-1,46 (m, 2H), 1,35-1,31 (m, 4H), 0,91 (t, *J*=6,8Hz, 3H), *m/z* 275,3 (M+H)+.

1-7. Síntesis de 2-heptiltio-1,4-naftoquinona (1g)

Se preparó 2-heptiltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó heptilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 46,4 %, Punto de fusión: 114-115 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,12-8,07 (m, 2H), 7,77-7,68 (m, 2H), 6,61 (s, 1H), 2,83(t, *J*=14,8Hz, 2H), 1,77(quint, *J*=7,6Hz, 2H), 1,52-1,45 (m, 2H), 1,35-1,29 (m, 6H), 0,90 (t, *J*=6,8Hz, 3H), *m/z* 289,2 (M+H)+.

1-8. Síntesis de 2-octiltio-1,4-naftoquinona (1h)

Se preparó 2-octiltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó octilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del

compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 76,8 %, Punto de fusión: 114-115 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,12-8,10 (m, 2H), 7,78-7,70 (m, 2H), 6,61 (s, 1H), 2,84 (t, J=7,6Hz, 2H), 1,77 (quint, J=7,6Hz, 2H), 1,49-1,47 (m, 2H), 1,35-1,29 (m, 8H), 0,89 (t, J=6,8Hz, 3H), m/z 304,5 (M+H)+.

5 1-9. Síntesis de 2-noniltio-1,4-naftoquinona (1i)

Se prepara 2-noniltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó nonilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

10 Rendimiento: 87,4 %, Punto de fusión: 105-106 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,12-8,07 (m, 2H), 7,77-7,68 (m, 2H), 6,61 (s, 1H), 2,83 (t, J=7,6Hz, 2H), 1,77 (quint, J=7,6Hz, 2H), 1,51-1,45 (m, 2H), 1,33-1,29 (m, 10H), 0,89 (t, J=6,4Hz, 3H), m/z 317,5 (M+H)+.

1-10. Síntesis de 2-deciltio-1,4-naftoquinona (1-j)

Se preparó 2-deciltio-1,4-naftoquinona que fue un cristal amarillo de la misma manera que la del Ejemplo 1-1, a excepción de que se utilizó decilmercaptano en lugar de tiometóxido sódico. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

15 Rendimiento: 87,4 %, Punto de fusión: 101-102 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8,12-8,08 (m, 2H), 7,77-7,68 (m, 2H), 6,61 (s, 1H), 2,83(t, J=7,2Hz, 2H), 1,77 (quint, J=7,6Hz, 2H), 1,50-1,42 (m, 2H), 1,33-1,29 (m, 12H), 0,88 (t, J=6,4Hz, 3H), m/z331,1 (M+H)+.

<Ejemplo 2>

20 2-1. Síntesis de 2-metilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5^a)

Se disolvieron 0,45 mM de 5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (4) preparado anteriormente en 30 ml de metanol en un matraz redondo de una boca de 100 ml y a continuación, se agregaron 0,687 mmoles de metilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, se vertieron 0,64 mM de dicromato sódico y 0,18 mM de ácido sulfúrico disuelto en agua lentamente a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 3 minuto. A continuación, se agregaron 50 ml de cloruro sódico saturado a la mezcla de reacción, seguido de extracción tres veces con 50 ml de cloroformo y se reunieron las capas orgánicas obtenidas y se deshidrataron con sulfato sódico anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida y se sometió el residuo a cromatografía de columna sobre gel de sílice produciendo así 2-metilamino-5,8- dimetoxi-1,4-naftoquinona que fue pardo rojizo. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

30 Rendimiento: 56,7 %, Punto de fusión: 203-204 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34 (d, J=9,6MHz), 7,19 (d, J=9,2MHz, 1H), 5,75 (ancho, 1H), 5,60 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 2,87 (d, J=5,2MHz, 3H), m/z 248(M+H)+.

2-2. Síntesis de 2-etilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5b)

Se preparó 2-etilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5b) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó etilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

35 Rendimiento: 23,6 %, Punto de fusión: 172-173 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34 (d, J=9,2Hz, 1H), 7,19 (d, J=9,6Hz, 1H), 5,63 (ancho, 1H), 5,61 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,09 (q, 2H), 1,29 (t, J=7,2Hz, 3H), m/z 262,1(M+H)+.

40 2-3. Síntesis de 2-propilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5c)

Se preparó 2-propilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5c) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó propilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

45 Rendimiento: 46,5 %, Punto de fusión: 175-176 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34(d, J=9,2Hz, 1H), 7,19 (d, J=9,2Hz, 1H), 5,72 (ancho, 1H), 5,61 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,09 (q, 2H), 1,68 (J=6,8Hz, 2H), 0,99 (t, J=7,6Hz, 3H), m/z 276 (M+H)+.

2-4. Síntesis de 2-butilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5d)

Se preparó 2-butilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5d) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó butilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

50 Rendimiento: 46,2 %, Punto de fusión: 104-105 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34 (d, J=9,6Hz, 1H), 7,19 (d, J=9,6Hz, 1H), 5,70 (ancho, 1H), 5,61 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,11 (q, 2H), 1,64 (p, 2H), 1,46-1,38 (m, 2H), 0,95 (t, J=7,2Hz, 3H), m/z 290(M+H)+.

2-5. Síntesis de 2-pentilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5e)

Se preparó 2-pentilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5e) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó pentilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

- 5 Rendimiento: 55,9 %, Punto de fusión: 102-103 °C ¹H-RMN (CDCl₃, 400): δ 7,34 (d, *J*=9,2MHz, 1H), 7,19 (d, *J*=9,2Hz, 1H), 5,70 (ancho, 1H), 5,61 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,11 (q, 2H), 1,29 (t, *J*=7,2Hz, 3H), *m/z* 303,6(M+H)+.

2-6. Síntesis de 2-hexilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5f)

Se preparó 2-hexilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5f) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó hexilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

- 10 Rendimiento: 47,3 %, Punto de fusión: 83-84 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 7,18 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 5,69 (ancho, 1H), 5,61 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,11 (q, 2H), 1,66-1,58 (m, 4H), 1,32-1,30 (m, 4H), 0,89 (t, *J*=6,8Hz, 3H), *m/z* 318(M+H)+.

2.7 Síntesis de 2-heptilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5g)

Se preparó 2-heptilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5g) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó heptilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

- 20 Rendimiento: 41,8 %, Punto de fusión: 74-75 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 7,33 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 7,18 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 5,69 (ancho, 1H), 5,60 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,11 (q, 2H), 1,66-1,61 (m, 2H), 1,35-1,29 (m, 8H), 0,89 (t, *J*=6,4Hz, 3H), *m/z* 332(M+H)+.

2-8. Síntesis de 2-octilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5h)

Se preparó 2-octilamino-5,8- dimetoxi-1,4-naftoquinona (5h) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó octilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

- 25 Rendimiento: 45,1 %, Punto de fusión: 81-82 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 7,18 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 5,69 (ancho, 1H), 5,61 (s, 1H), 3,96(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,11 (q, 2H), 1,68-1,61 (m, 2H), 1,41-1,20 (m, 10H), 0,88 (t, *J*=6,4Hz, 3H), *m/z* 346(M+H)+.

2-9. Síntesis de 2-nonilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5i)

Se preparó 2-nonilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5i) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó nonilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

- 30 Rendimiento: 44,0 %, Punto de fusión: 85-86 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34 d, *J*=9,6Hz, 1H), 7,18 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 5,69 (ancho, 1H), 5,61 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,11 (m, 2H), 1,66-1,61 (m, 2H), 1,41-1,20 (m, 12H), 0,88 (t, *J*=6,4Hz, 3H), *m/z* 360(M+H)+.

2-10. Síntesis de 2-decilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5j)

Se preparó 2-decilamino-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5j) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó decilamina en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

- 40 Rendimiento: 17,6 %, Punto de fusión: 86-87 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,33 (d, *J*=9,2Hz, 1H), 7,18 (d, *J*=9,2Hz, 1H), 5,69 (ancho, 1H), 5,60 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,11 (q, 2H), 1,66-1,61 (m, 2H), 1,40-1,20 (m, 14H), 0,88 (t, *J*=6,4Hz, 3H), *m/z* 374(M+H)+.

2-11. Síntesis de 2-(2-hidroxietiltio)-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5k)

Se preparó 2-(2-Hidroxietiltio)-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5k) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó 2-mercaptoethanol en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

- 45 Rendimiento: 59,5 % Punto de fusión: 117-118 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 7,28 (d, *J*=9,6Hz, 1H), 6,61 (s, 1H), 3,96 (s, 6H), 3,93 (t, *J*=6,4Hz, 2H), 3,05 (t, *J*=6,4Hz, 2H), *m/z* 316,9 (M+Na)+.

2-12. Síntesis de 2-(3-hidroxipropiltio)-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5l)

Se preparó 2-(3-Hidroxipropiltio)-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5l) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó 3-mercaptopropanol en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

- 50

Rendimiento: 69,9 %, Punto de fusión: 125~126 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,33 (d, J=9,6Hz, 1H), 7,27 (d, J=9,6Hz, 1H), 6,51 (s, 1H), 3,96 (s, 6H), 3,81 (t, J=6,4Hz, 2H), 2,91 (t, J=7,2Hz, 2H), 1,99 (m, 2H), m/z 331,1 (M+Na)+.

2-13. Síntesis de 2-(4-hidroxibutiltio)-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5m)

5 Se preparó 2-(4-Hidroxibutiltio)-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5m) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó 4-mercaptobutanol en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

10 Rendimiento: 64,0 %, Punto de fusión: 122-123 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,33 (d, J=9,6Hz, 1H), 7,29 (d, J=10,0Hz, 1H), 6,46 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,71 (t, J=6,4Hz, 2H), 1,87-1,81 (m, 2H), 1,78-1,50 (m, 2H), m/z 345,1 (M+Na)+.

2-14. Síntesis de 2-(6-hidroxihexiltio)-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5n)

Se preparó 2-(6-hidroxihexiltio)-5,8-dimetoxi-1,4-naftoquinona (5n) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó 6-mercaptohexanol en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

15 Rendimiento: 38,2 % Punto de fusión: 87~88 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,33 (d, J=9,6Hz, 1H), 7,27 (d, J=9,6Hz, 1H), 6,45 (s, 1H), 3,96 (s, 6H), 3,66 (t, J=6,4Hz, 2H), 2,76 (t, J=7,6Hz, 2H), 1,78-1,12 (m, 2H), 1,61-1,25 (m, 6H), m/z372,9 (M+Na)+.

2-15. Síntesis de ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-naftalen-2-iltio)propanoico (5o)

20 Se preparó ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-naftalen-2-iltio)propanoico (5o) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó 3-mercaptopropionico ácido en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 80,6 %, Punto de fusión: 208~209 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,35 (d, J=9,2Hz, 1H), 7,28 (d, J=13,6Hz, 1H), 6,51 (s, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,96(s, 3H), 3,07 (t, J=7,2Hz, 2H), 2,81 (t, J=7,2Hz, 2H), m/z 348,4 (M+Na)+.

2-16. Síntesis de ácido 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-naftalen-2-iltio)undecanoico (5p)

Se preparó ácido 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-naftalen-2-iltio)undecanoico (5p) de la misma manera que la del Ejemplo 2-1, a excepción de que se utilizó ácido 11-mercaptoundecanoico en lugar de metilamina en el matraz redondo de Ejemplo 2-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

30 Rendimiento: 77,9 %, Punto de fusión: 146-147 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,33 d, J=9,6Hz, 1H), 7,27 (d, J=9,6Hz, 1H), 6,46 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,34 (t, J=7,2Hz, 2H), 2,75 (t, J=2,7Hz, 2H), 2,41~2,32 (m, 5H), 2,06~2,00 (m, 2H), 1,76~1,56 (m, 5H), 1,48~1,39 (m, 2H), 0,97~0,88 (m, 2H), m/z 435 (M+H)+.

<Ejemplo 3>

3-1. Síntesis de 5,8-dimetoxi-2-(3-oxo-3-(4-fenilpiperazin-1-il)propiltio)naftalen-1,4-diona (6a)

35 Se disolvieron ácido 0,163 mM 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)propanoico preparado anteriormente en 40 ml de cloroformo en matraz redondo de una boca de 100 ml, y a continuación se agregaron 0,26 mM de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodimida (EDC) y 0,26 mM 4-fenilpiperidina y se agitó toda la noche. Se agregó ácido clorhídrico 1N a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación, se agregaron 50 ml de solución saturada de cloruro sódico, seguido de extracción tres veces con 50 ml de cloroformo y se reunieron las capas orgánicas obtenidas y se deshidrataron con sulfato sódico anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida y se sometió el residuo a cromatografía de columna sobre gel de sílice, produciendo así 5,8-dimetoxi-2-(3-oxo-3-(4-fenilpiperazin-1-il)propiltio)naftalen-1,4-dione (6a) que fue pardo rojizo. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

40 Rendimiento: 73,5 %, Punto de fusión: 94~95 °C, H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ 7,34~7,28 (m, 5H), 7,19 (d, J=7,6Hz), 6,26(s, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,14 (t, 4H), 2,79~2,74 (q, 4H), 2,67 (t, J=12Hz, 1H), 1,89 (t, J=12,4Hz, 2H), 1,65 (t, J=12,4Hz, 2H), m/z 466,3 (M+H)+.

<Ejemplo 4>

4-1. Síntesis de -11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)undecanoato de isobutilo (7a)

50 Se disolvió ácido 1,15 mM 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)undecanoico (5p) preparado anteriormente en 60 ml de cloroformo en un matraz redondo de una boca de 100 ml y, a continuación, se agregaron 1,38 mM de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodimida (EDC) y se agregaron 1,38 mM de alcohol isobutilico y se agitó durante toda la noche. Se agregó 1N ácido clorhídrico a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación, se agregaron 50 ml de solución saturada de cloruro sódico, seguido de extracción tres veces con 50 ml de cloroformo, y se reunieron las capas orgánicas obtenidas, se deshidrataron con sulfato sódico anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida y se sometió el

residuo a cromatografía de columna sobre gel de sílice, produciendo así 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)undecanoato de isobutilo (7a) que fue pardo rojizo. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

5 Rendimiento: 52,4 %, Punto de fusión: 58-59 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,32(d, J=9,6Hz, 1H), 7,26 (d, J=9,6Hz, 1H), 6,44 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,85 (d, J=6,8Hz, 2H), 2,75 (t, J=7,6Hz, 2H), 2,31 (t, 7,6Hz, 2H), 1,96-1,89 (m, 1H), 1,72-1,68 (m, 4H), 1,29-1,25 (m, 12H), 0,94 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), m/z 491 (M+H)+.

4-2. Síntesis de 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)-N-isobutil undecanamida (7b)

10 Se preparó 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio)-N-isobutil undecanamida (7b) de la misma manera que la del Ejemplo 4-1, a excepción de que se utilizó isobutilamina en lugar de alcohol isobutílico en el matraz redondo de Ejemplo 4-1. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

Rendimiento: 77,9 %, Punto de fusión: 74-75 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,33 (d, J=9,6Hz, 1H), 7,27 (d, J=9,2Hz), 6,44 (s, 1H), 5,55 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,10 (t, J=6,6Hz, 2H), 2,75 (t, J=7,6Hz, 2H), 2,17 (t, J=7,4Hz, 2H), 1,78-1,7 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,45 (m, 1H), 0,92 (s, 3H), 0,90 (s, 3H), m/z 490,0 (M+H)+.

<Ejemplo 5>

15 5-1. Síntesis de 11-(5,8-dimetoxil-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il sulfinil) undecanoato de isobutilo (8)

20 Se disolvieron 0,163 mM de 11-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxo-1,4-dihidroxinaftalen-2-iltio)-undecanoato de isobutilo (7a) preparado anteriormente en 30 ml de diclorometano en un matraz redondo de una boca de 100 ml y a continuación, se agregaron 0,196 mM de ácido 3-cloroperoxibbenzoico y se agitó durante 2 horas. Se agregó bicarbonato sódico a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación, se agregaron 50 ml de solución saturada de cloruro sódico, seguido de extracción tres veces con 50 ml de cloroformo y se reunieron las capas orgánicas obtenidas y se deshidrataron con sulfato sódico anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado a presión reducida y se sometió el residuo a cromatografía de columna sobre gel de sílice, produciendo así 11-(5,8-dimetoxil-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il sulfinil) undecanoato de isobutilo (8) que fue rojo. El rendimiento y las propiedades del compuesto sintetizado fueron las siguientes.

25 Rendimiento: 45,8 %, Punto de fusión: 92~93 °C, ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 7,41 (d, J=9,6Hz, 1H), 7,36 (d, J=9,6Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,98 (s, 3H), 3,85 (d, J=6,8Hz, 1H), 3,28~3,21 (m, 1H), 2,96~1,89 (m, 2H), 1,69~1,59 (m, 4H), 1,41~1,23 (m, 12H), 0,93 (d, J=6,8MHz, 6H), m/z 507 (M+H)+.

Se confirmaron los ejemplos de los compuestos sintetizados tal como se ha descritos en cuanto a la inhibición de la unión de Snail-p53 en los experimentos que se exponen a continuación.

30 <Ejemplo experimental 1> Confirmación de la recuperación de actividad de p53 e inducción de gen diana

Para confirmar si los compuestos preparados de acuerdo con los Ejemplos 1 a 5 son eficaces para inhibir la unión Snail-p53 a nivel celular, se trataron con el compuesto líneas celulares de cáncer K-Ras mutante HCT116 y se analizaron los resultados por transferencia de Western.

35 K-Ras oncogénico suprime la actividad de p53 a través de Snail. En la línea celular HCT116, Snail se expresa siempre por mutación K-Ras y se une a p53 para suprimir la actividad normal de p53. Si se trata la línea celular de cáncer K-Ras mutante HCT116 con un compuesto para suprimir la unión Snail-p53, normalmente se activa p53 y se expresa más y se inducen los genes diana de p53.

40 En primer lugar, se llevó a cabo la transferencia de western para detectar la expresión de p53 y p21, que es un gen diana de p53. Todas las líneas celulares utilizadas en la presente invención se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en RPMI-1640 con contenido en FBS al 10 % o DMEM. Se extrajo la proteína con solución de tampón RIPA y se preparó una membrana cargada con lisado celular a través de SDS PAGE y procedimiento de transferencia de gel. Después del bloqueo con leche deshidratada sin grasa al 5 %, se sometió la membrana a un procedimiento de transferencia de Western típico con un anticuerpo, correspondiente a cada gen. Los anticuerpos utilizados en este punto fueron obtenidos de Cell signaling, SantaCruz. Se confirmó la actividad de p53 por expresión de p21, que es un gen diana de p53. En la Fig. 1 se muestran imágenes y gráficos que presentan los resultados de la transferencia de Western de células HCT116, líneas celulares de cáncer K-Ras mutante, utilizando algunos de los compuestos de los Ejemplos 1 a 5 y en la Tabla 3 a continuación, se muestran los valores numéricos de los resultados.

[Tabla 3]

Gen	Control	Relación de expresión de proteína entre compuesto y control												
	Control DMSO	5i	5j	5k	5l	5n	5m	5o	5p	8	7b	7a	6a	6b
p53	1,0	1,6	1,3	0,3	0,6	1,1	0,8	2,6	1,6	2,3	4,6	4,2	1,9	4,0
p21	1,0	4,6	5,0	0,2	0,1	0,2	0,1	2,5	0,3	1,7	7,0	7,2	2,8	8,7

50

En lo que se refiere a los resultados del tratamiento de los compuestos a una concentración de 10 mM en líneas celulares de cáncer HCT116 K-Ras mutante, uno de los compuestos presentó la expresión de p53 de 2 a 5 veces más intensa que la del control DMSO y otro compuesto presentó expresión de p21 de 2 a 8 veces más intensa que la del control DMSO (véase FIG. 20 y Tabla 3). La expresión potenciada de p53 y p21 como gen diana de p53 mediante los compuestos indica que las funciones de Snail se suprimen con los compuestos en las líneas celulares HCT116 K-ras mutantes en las que se activa siempre Snail y se mantiene la inhibición de unión Snail-p53.

<Ejemplo experimental 2> Confirmación de efecto de inhibición de unión Snail-p53

A continuación, se seleccionaron entre los compuestos que indujeron p53 y p21 y que presentaron una expresión intensa, los compuestos 5o y 7a para identificar las relaciones entre K-Ras, Snail y p53 para probar la inhibición de unión Snail-p53. Se llevó a cabo el ensayo GST desplegable utilizando compuestos 5o y 7a.

El ensayo GST desplegable es un procedimiento para identificar un grado de unión de las dos proteínas. Se prepararon proteína Snail fusionada con GST y proteína recombinante p53 y se trataron con el compuesto 5o o 7a para identificar un grado de unión de proteína Snail GST y proteína p53. Se utilizó Nutlina-3 m control para los compuestos. Se sabe que Nutlina-3 es una proteína que bloquea la unión entre p53 y MDM2, que se utiliza como factor de control negativo de p53 se sobre-expresa en varias células de tumor. Si se sobreexpresa MDM2, se induce la proteólisis de p53 para suprimir la apoptosis que tiene lugar a través de los genes diana de p53 y se induce un efecto anti-proliferación de células. A pesar de que MDM2 es un factor de control representativo de p53, MDM2 no se aplica a la enfermedad K-Ras mutante o la enfermedad que contiene p53 mutante.

Para llevar a cabo el ensayo GST desplegable, se expresaron tres fragmentos Snail (restos 1-90, 91-112, y 113-264) y fragmentos p53 (1-93 y 93-292) en *E.coli* como proteína de fusión con GST. Se cargó cada uno de los fragmentos en GSH-agarosa, se lavó y después se eluyó utilizando un tampón que contenía 20 mM de glutatona reducida. Se purificaron las fracciones eluidas utilizando cromatografía de intercambio de aniones (HitrapQ). Se expresó la proteína p53 recombinante humana (restos 94-292) en *E.coli* utilizando el vector pET28A que contiene una etiqueta hexa-histidina en el término C. Se purificó la proteína p53 que incluía la etiqueta hexa-histidine utilizando cromatografía de exclusión de tamaño y afinidad Ni-NTA (Superdex 200). Para confirmar la unión directa entre p53 y Snail, se incubó GST conjugado con perlas de agarosa o GST-Snail con His-p539 (histidine-p53) en PBS durante 45 minutos a 4 °C. Después de lavado con PBS, se sometió la proteína precipitada a SDS-PAGE y transferencia de Western.

Tal como se muestra en la FIG. 21, los resultados del ensayo GST desplegable demuestran que en el caso de control (c), la unión entre GST-Snail y p53 fue intensa. Dado que Nutlina-3 controla también MDM2 e induce actividad p53, no inhibió la unión Snail-p53 y presentó un grado de unión similar al del control. EN cambio, en las fracciones en las que se utilizaron los compuestos 5o y 7a, la unión entre GST-proteína Snail y p53 fue sustancialmente débil. Este resultado demuestra que los compuestos inhibieron la unión Snail-p53.

<Ejemplo experimental 3> Confirmación de capacidad de inducción de p53 dependiente de K-Ras

Para confirmar que los compuestos no afectaron a células normales y que afectaron selectivamente solamente a células de cáncer K-Ras mutantes para inducir apoptosis, se confirmaron los efectos de citotoxicidad y apoptosis de los compuestos 5o y 7a a través de la vitalidad de la célula, el recuento del número de células utilizando una solución de azul de trifano. Para confirmar que la inducción de p53 de los compuestos se relaciona con K-Ras, se utilizaron A549 y HCT116, que son líneas celulares de cáncer K-ras mutante, y MKN45, que es una línea celular de cáncer de tipo K-Ras silvestre.

En la Tabla 4, se muestran los valores numéricos de la tasa de mortalidad de las correspondientes líneas celulares y en la Fig. 22 se muestra un gráfico en el que se presentan los valores numéricos de las tasas de mortalidad.

[Tabla 4]

Tipo de célula de cáncer	Control (%)	Tasa de mortalidad de célula de cáncer de compuestos frente al control (%)								
	Control (DMSO)	5o			7a			Nutlina-3		
		0 µM	5 µM	10 µM	20 µM	5 µM	10 µM	20 µM	5 µM	10 µM
A546 (K-Ras mutante)	1±1,3	30±4,5	51±1,1	62±1,7	23±3,4	34±2,3	45±2,3	11±4,0	19±4,5	25±4,7
HCT116 (K-Ras mutante)	1±1,2	35±3,2	57±1,6	67±2,5	32±2,1	44±2,5	57±2,8	21±2,4	32±2,9	40±3,1
MKN45 (K-Ras tipo silvestre)	1±1,1	10±2,9	15±2,4	18±1,9	1±1,0	1± 1,0	3± 2,4	28±2,2	38±2,9	47±2,2

En lo que respecta a los resultados obtenidos a través de las tasas de mortalidad celular, en A549 y HCT116, que son líneas celulares de cáncer K-Ras mutante, el compuesto 5o presentó a la misma concentración de aproximadamente 10 µM, tasas de mortalidad de aproximadamente 51 % y aproximadamente 57 %, respectivamente y el compuesto 7a presentó a la misma concentración de aproximadamente 10 µM, tasas de mortalidad de aproximadamente 34 % y aproximadamente 44 %, respectivamente (véase Tabla 4 y FIG. 22). En cambio, a diferencia de las líneas celulares de cáncer K-Ras mutante, en MKN45, que es una línea celular de cáncer K-Ras de tipo silvestre, a la misma concentración de aproximadamente 10 µM, el compuesto 5o presentó una tasa de mortalidad de aproximadamente 15 %, y el compuesto 7a presentó una tasa de mortalidad de aproximadamente 1 %. Estos resultados demuestran que los compuestos afectan selectivamente únicamente a líneas celulares de cáncer en las que K-Ras está activado normalmente y presentan tasas de mortalidad altas. Este resultado implica que los compuestos afectan selectivamente únicamente a células de cáncer lesionadas K-Ras y por tanto, son útiles para pacientes que desarrollan cáncer por lesión K-ras. Por otra parte, los resultados de Nutlina-3 no son consistentes. Es decir, Nutlina-3 presentó tasas de mortalidad de 19 % y 32 % respectivamente en A549 y HCT116, que son líneas celulares de cáncer K-Ras mutante, a la misma concentración de 10 µM, y presentó una tasa de muerte celular de 38 % en MKN45, que es una línea celular de cáncer KJ-Ras de tipo silvestre, a la misma concentración de 10 µM. Tal como se ha descrito, se confirmó que Nutlina-3 no presentó una reactividad significativa independientemente del estado normal o estado mutante de K-ras y no presentó una reactividad selectiva para K-ras. Por lo tanto, se confirmó que a diferencia de Nutlina-3, los compuestos 5o y 7a afectan selectivamente a K-Ras.

<Ejemplo experimental 4> Inducción de genes diana de actividad p53

A continuación, se comprobó el efecto del compuesto 5o en p53 mutante.

Se trató con el compuesto 5o el gen MT/WT-p53 tipo p53-mutante que contenía MDA-MB 468, una línea celular de cáncer de mama humana y se llevó a cabo la transferencia de Western. En la Fig. 23 se muestra un gráfico en el que se presentan los resultados de la transferencia de Western cuando se trató MDA-MB con el compuesto 5o y en la Tabla 5 se muestran los valores numéricos del gráfico.

[Tabla 5]

Gen	Control (DMSO control)	Relación de expresión entre gen y control con respecto al compuesto 5o			Control (DMSO control)	Relación de expresión entre gen y control con respecto a Nutlina-3		
		5 µM	10 µM	20 µM		5 µM	10 µM	20 µM
p21	1,0	13,5	25,9	31,3	1,0	1,4	0,9	1,2

Cuando se trataron con el compuesto 5o y Nutlina-3 líneas celulares de cáncer de tipo p53 mutante MDA-MB 468, la expresión de p21 fue intensa solamente cuando se trataron con el compuesto 5o (véase FIG. 23 y Tabla 5). El resultado demuestra que Nutlina-3 no afectó p21 como gen diana en presencia de p53 mutante y a diferencia de Nutlina-3, el compuesto 5o indujo actividad de p21.

<Ejemplo experimental 5> Xenoinjerto *in vivo*

1. Procedimiento experimental

Se obtuvo un ratón atímico de Daehan Biolink Co. Ltd, y se criaron en condiciones de temperatura y luz (20-23 °C, ciclo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad) con una alimentación de dieta estéril y libre acceso a agua. Al cabo de 2 semanas, se inocularon 1 x 10⁷ células A549 en el ratón atímico (n= 21) por inyección intraperitoneal. Al cabo de 2 semanas, se dividió cada grupo en tres subgrupos y se inyectaron por vía intraperitoneal 10 mg/kg o 20 mg/kg del compuesto 5o una vez a la semana durante 10 semanas y se midió la vitalidad. La prueba con animales estaba aprobada por el Comité de Protección de animales de la Universidad Nacional de Pusan y se llevó a cabo de acuerdo con las directrices presentadas por el mismo.

2. Resultados experimentales

Tal como se muestra en FIG. 24, cuando se trataron con 10 mg/kg y 20 mg/kg del compuesto 5o, se previno la muerte causada por tumor. Por otra parte, la vitalidad del grupo de tratamiento con PBS al cabo de 10 semanas fue igual o inferior a 50 %, y tal como se muestra en FIG. 25, el grupo tratado con el compuesto 5o no presentó tumor prácticamente. Por otra parte, tal como se muestra en FIG. 26, no se observó ningún hallazgo anormal anatómico en general de acuerdo con la pérdida de peso o la inyección del compuesto. En la Tabla 6 se muestran los sitios de desarrollo de tumor y las características morfológicas de los mismos.

[Tabla 6]

Sitio de tumor	Control	10 mg/kg	20 mg/kg
Hígado	1 (muerte)	0	0
Pulmón	1 (muerte)	0	0
Páncreas	2(1/2 muertes)	0	0
A.C	2	3 (regresión)	2 (regresión)

5 Las realizaciones ilustrativas de la presente invención se describen en las siguientes cláusulas: un procedimiento de cribado de un agente terapéutico para cáncer K-Ras mutante, comprendiendo dicho procedimiento: el cultivo de Snail y un fármaco candidato en una placa en la que se inmoviliza p53; y la identificación selectiva un fármaco candidato para inhibir la unión de Snail-p53 utilizando un lector de ELISA.

[Lista de secuencias anterior al texto]

La SEQ ID NO: 1 presenta una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de tumor celular p53 humano.

<110> Pusan National University Industry-University Cooperation Foundation

10 <120> Procedimiento de administración de fármaco específico para célula K-ras mutante y procedimiento de diagnóstico temprano de enfermedad de cáncer inducida por mutación de K-Ras.

<130> OP-2009-0035

<160> 1

<170> KopatentIn 1,71

15 <210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> Antígeno de tumor de p53 celular humano

<400> 1

ES 2 715 769 T3

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
 1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
 20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
 35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
 50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
 65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
 85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
 100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
 115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
 130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390

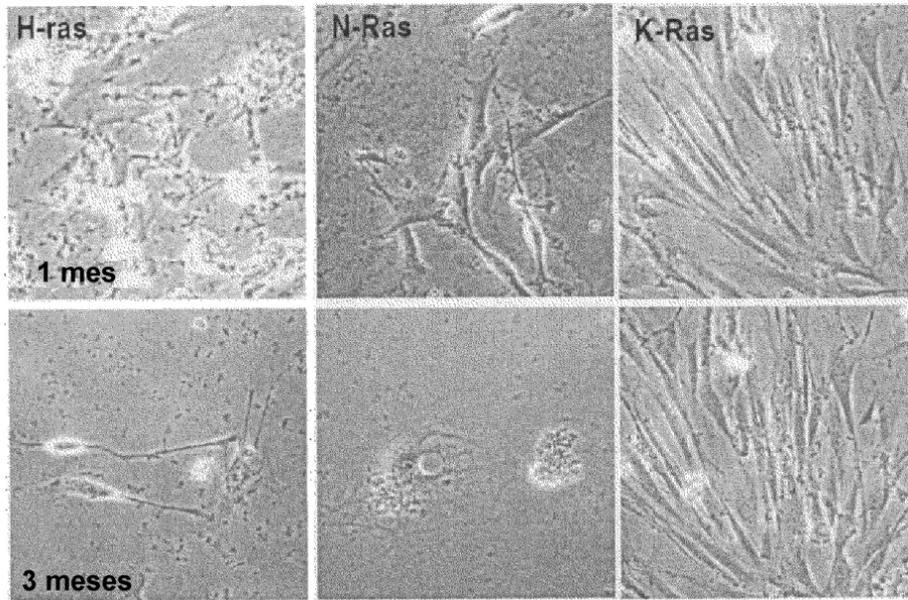
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cribado de un agente terapéutico para el cáncer mutante K-Ras, comprendiendo el procedimiento:

- 5 cultivar Snail y un fármaco candidato sobre una placa en la que se inmoviliza p53; y
cribar un fármaco candidato para inhibir la unión de Snail-p53 utilizando un lector ELISA.

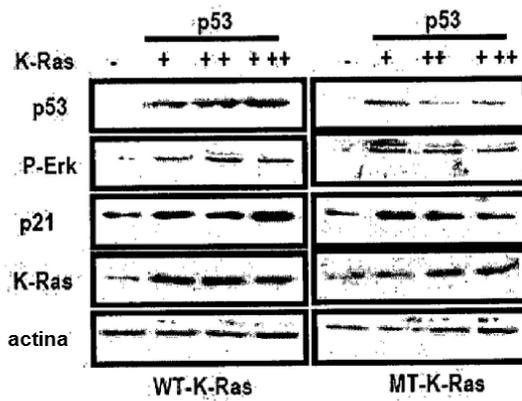
[FIG. 1]

A.

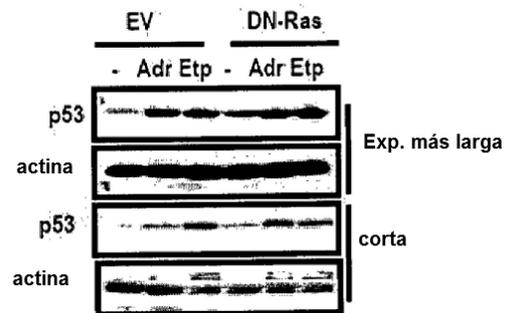


Fibroblasto de pulmón de ratón adulto

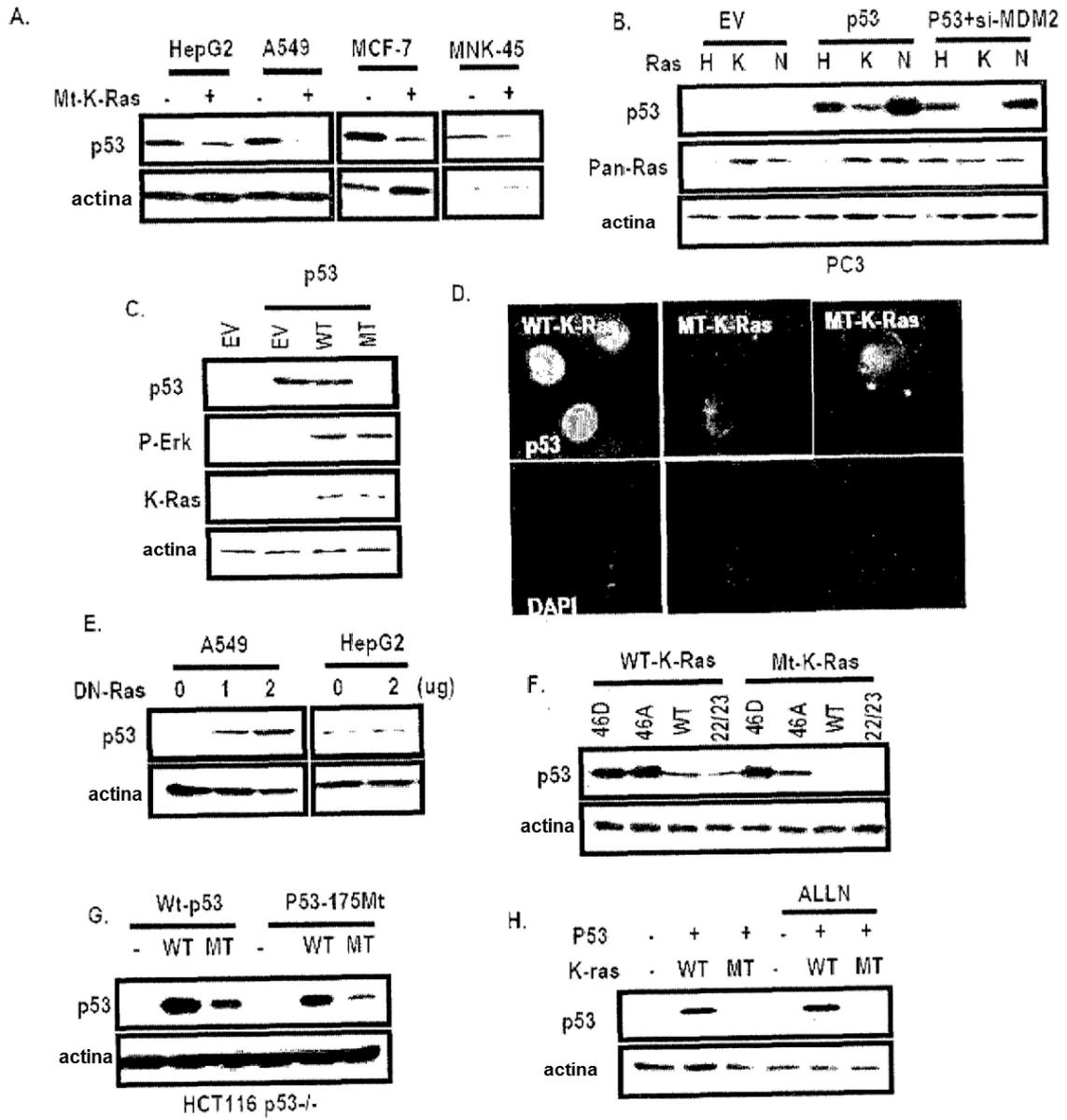
B.



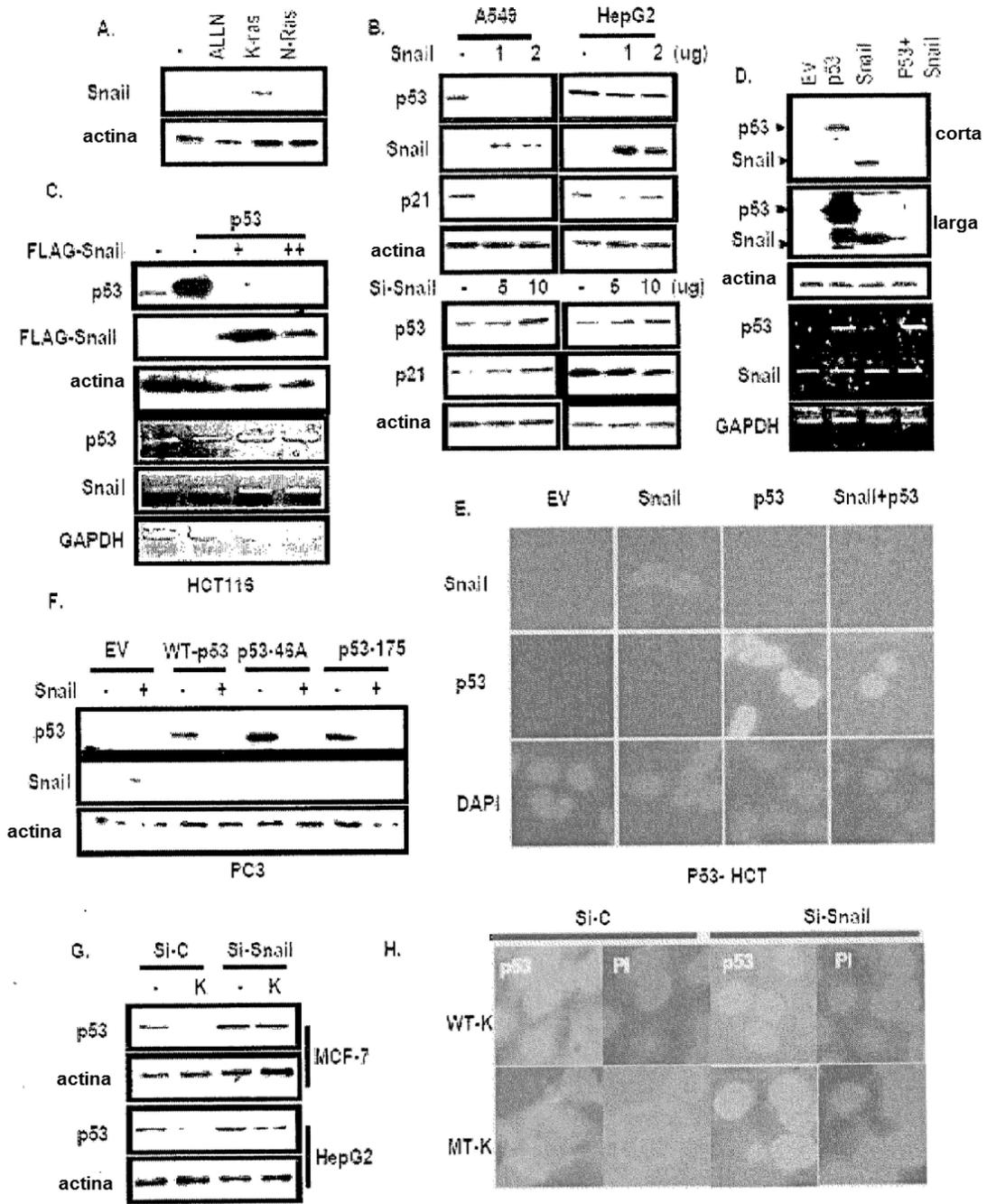
C.



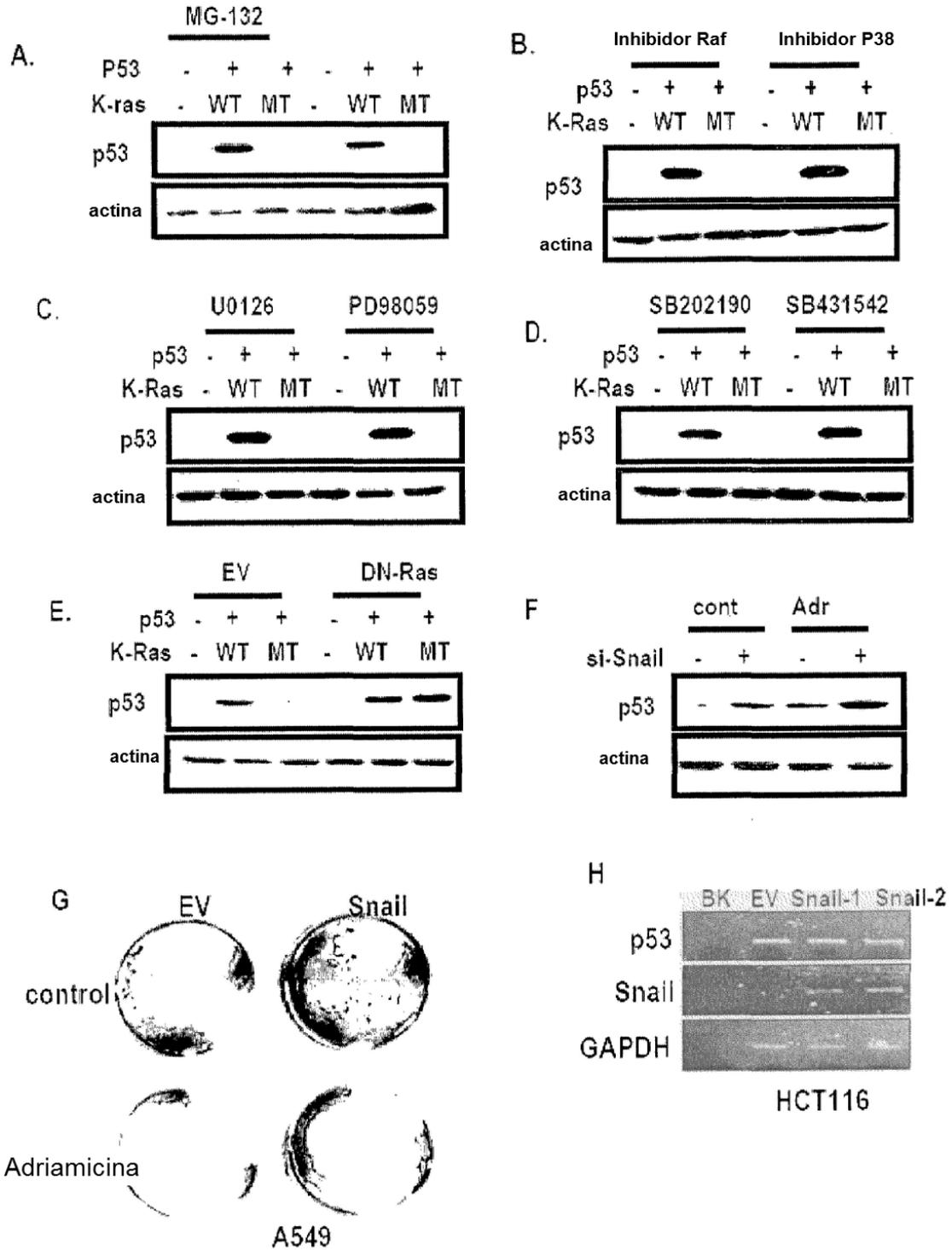
[FIG. 2]



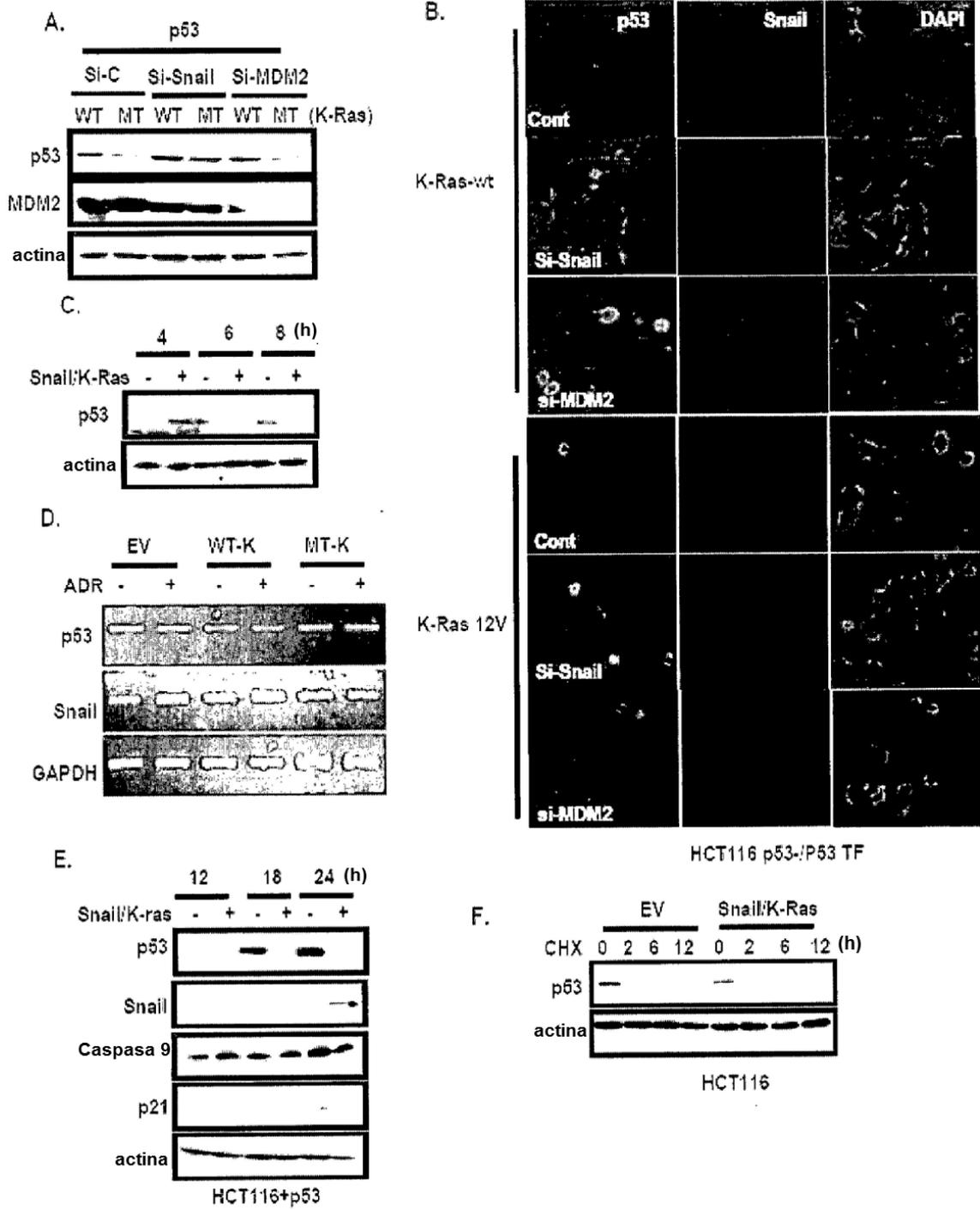
[FIG. 3]



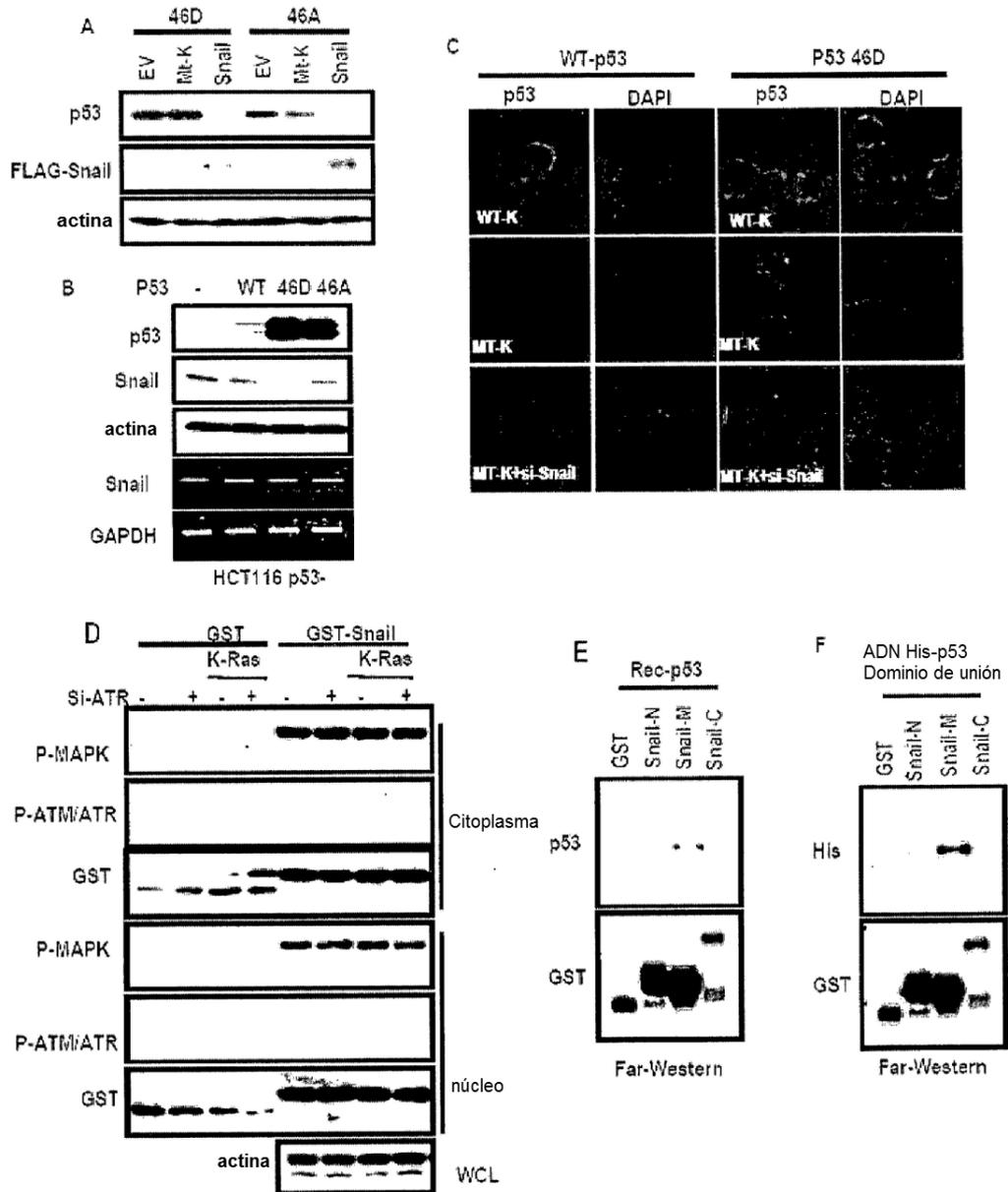
[FIG. 4]



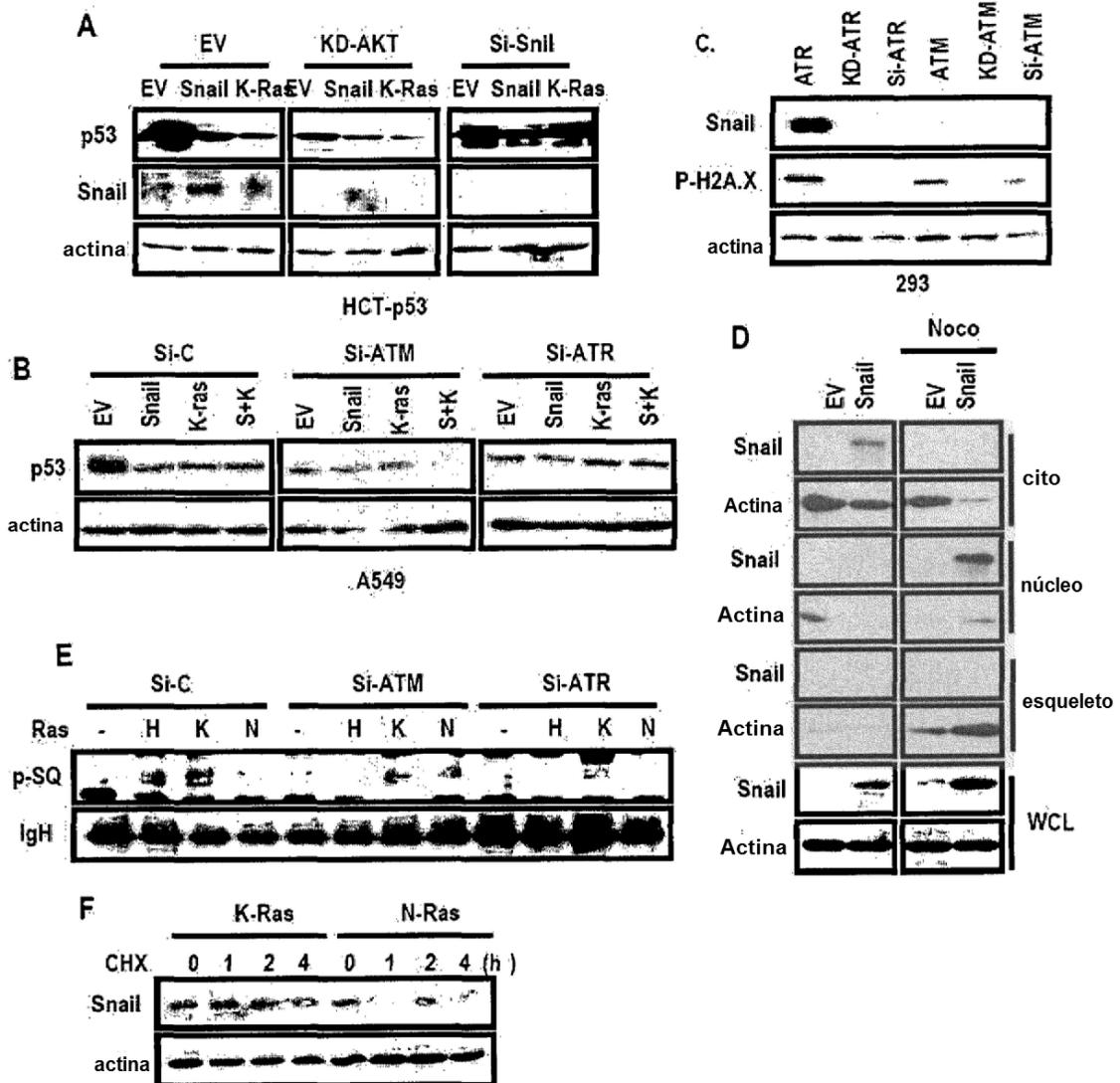
[FIG. 5]



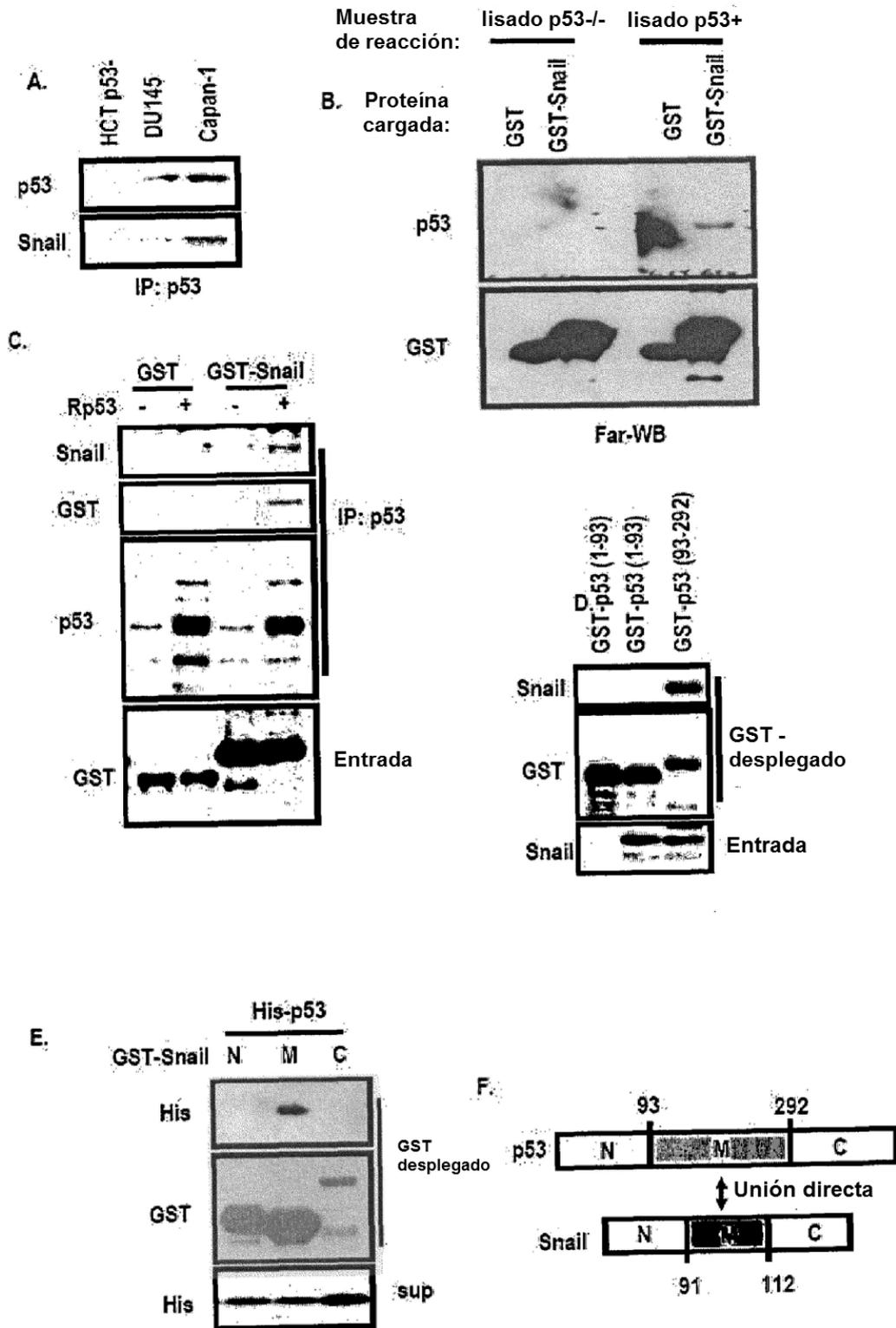
[FIG. 6]



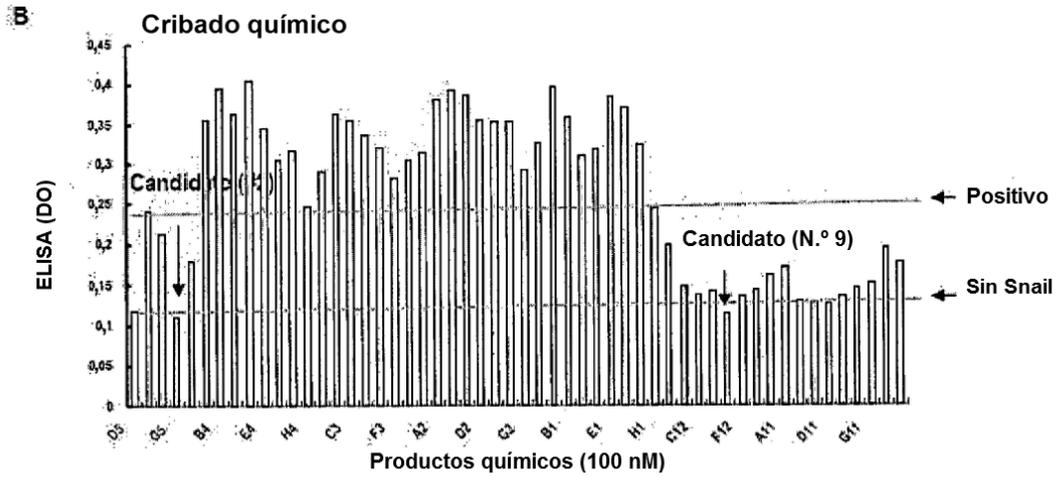
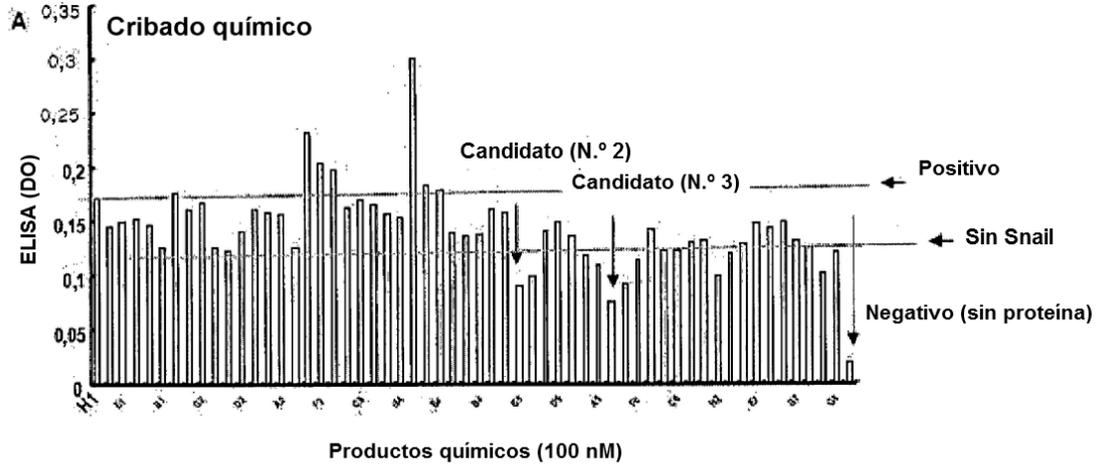
[FIG. 7]



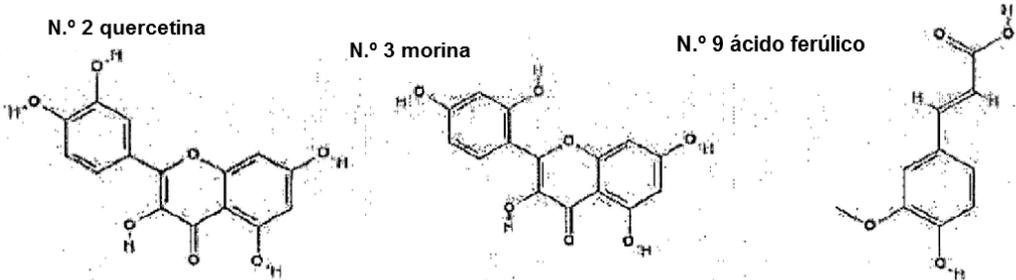
[FIG. 8]



[FIG. 9]

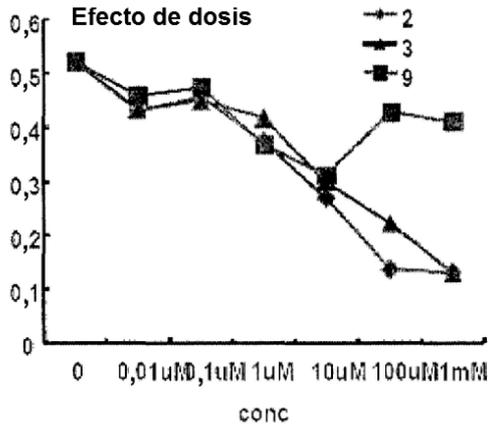


C. Estructura química de candidatos

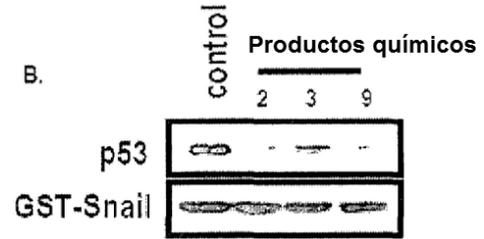


【FIG. 10】

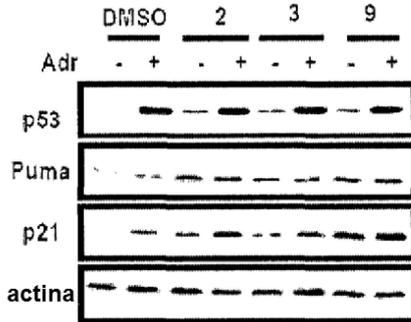
A.



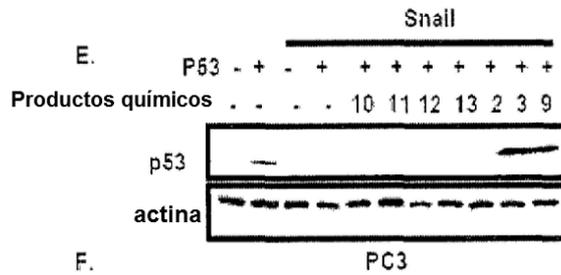
B.



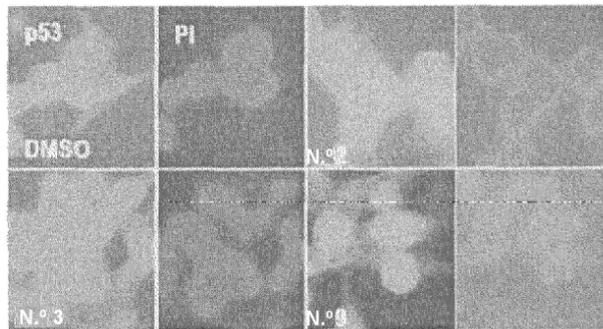
C.



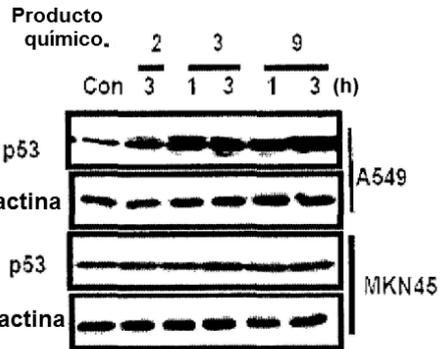
E.



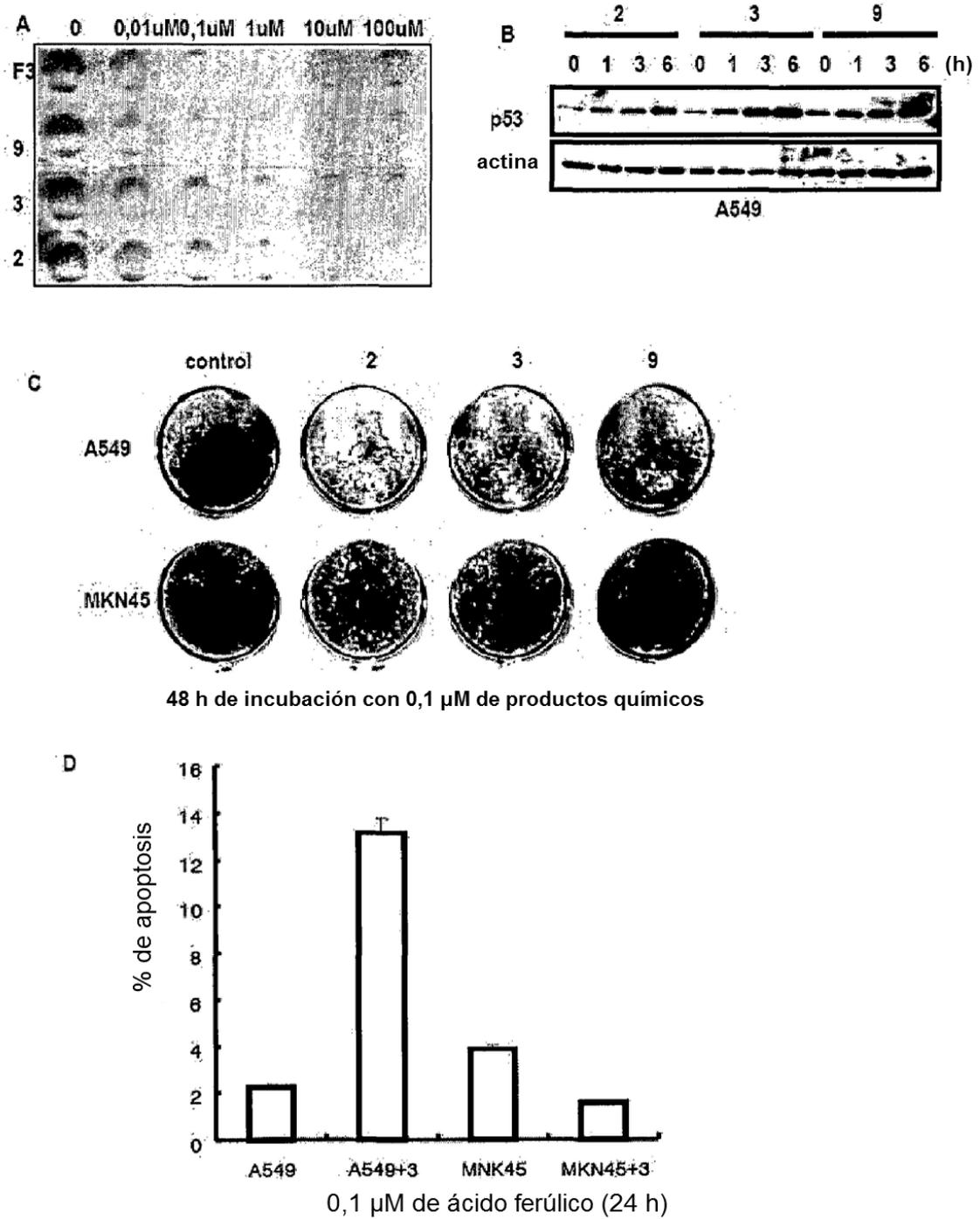
F.



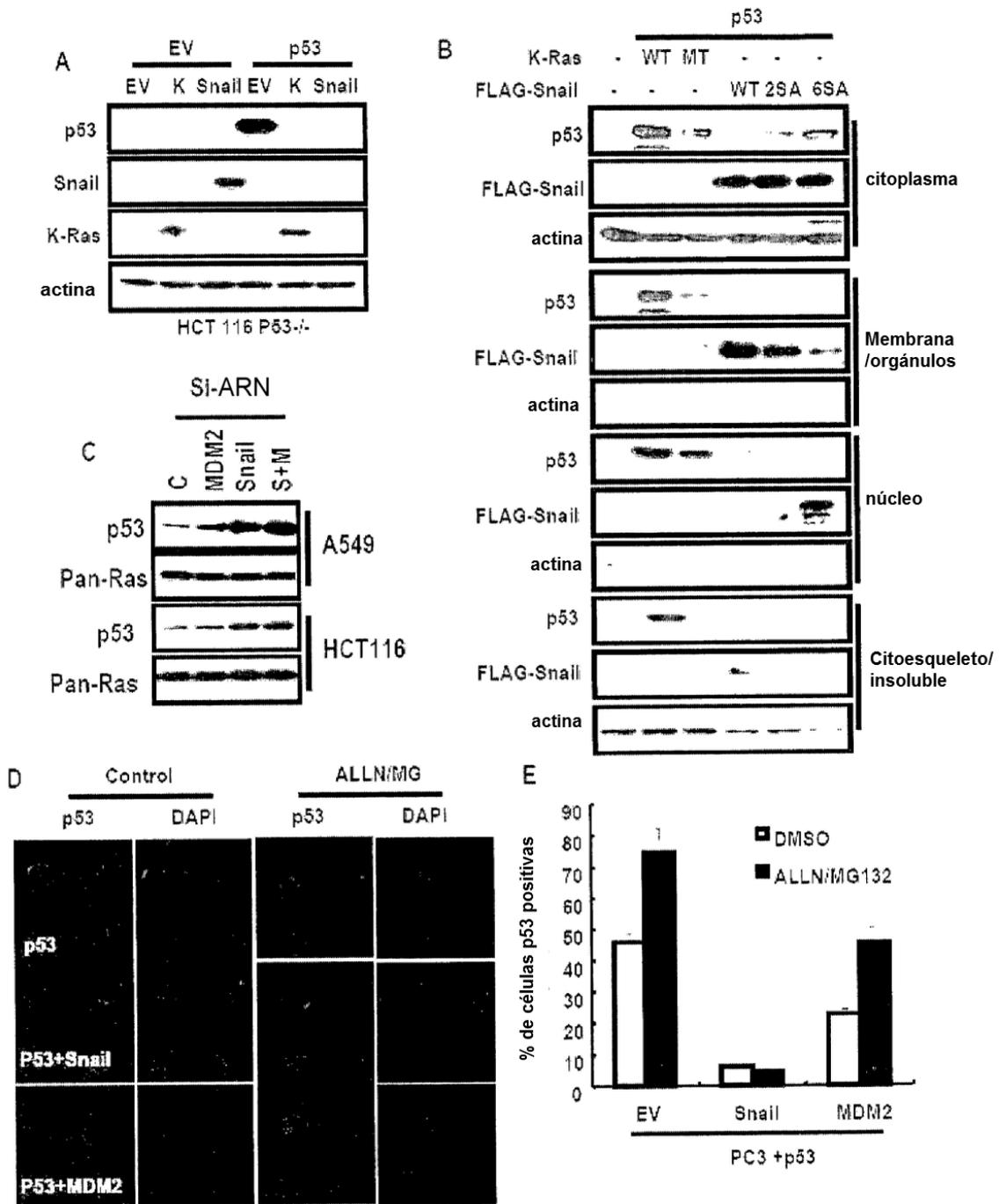
D.



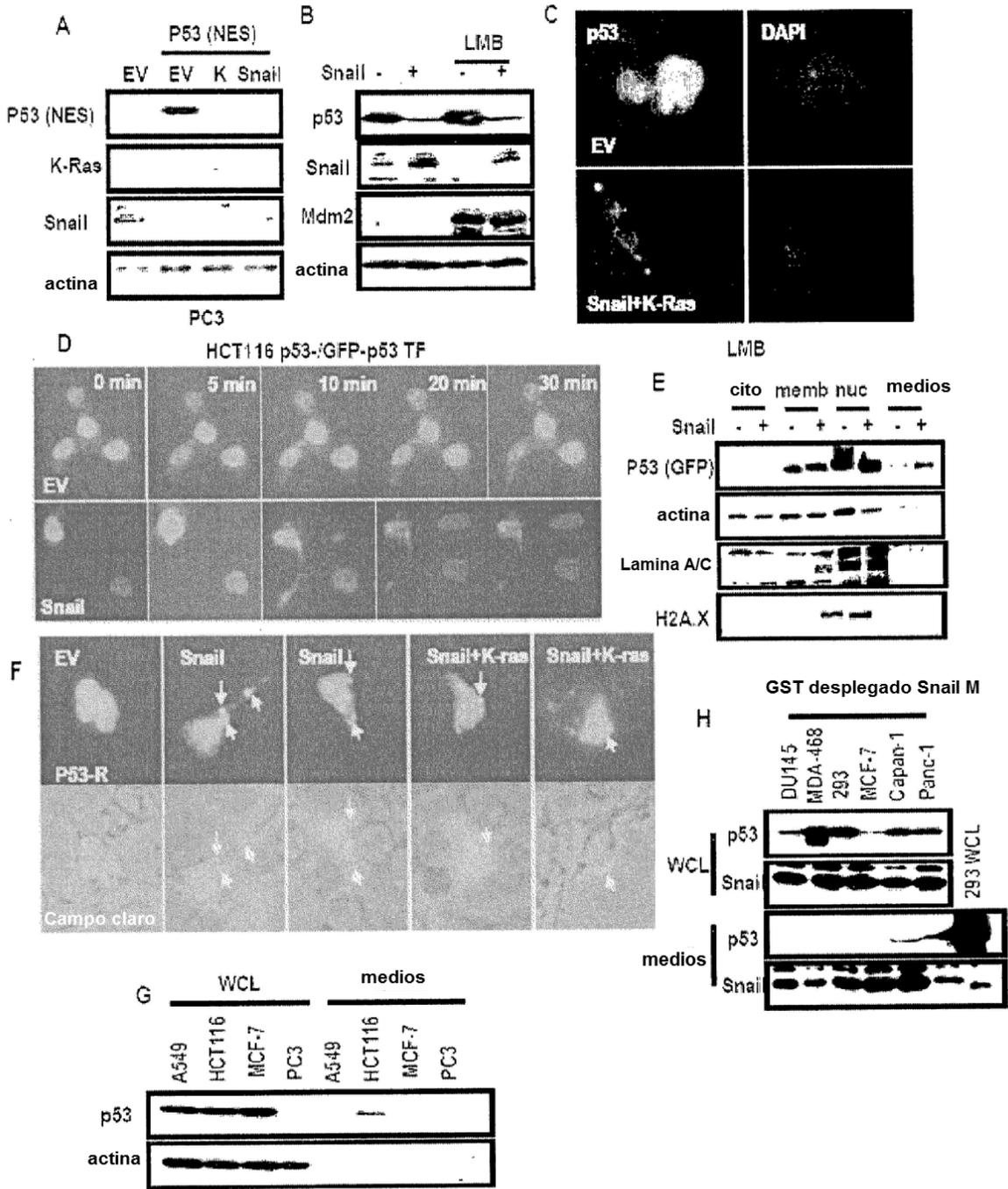
[FIG. 11]



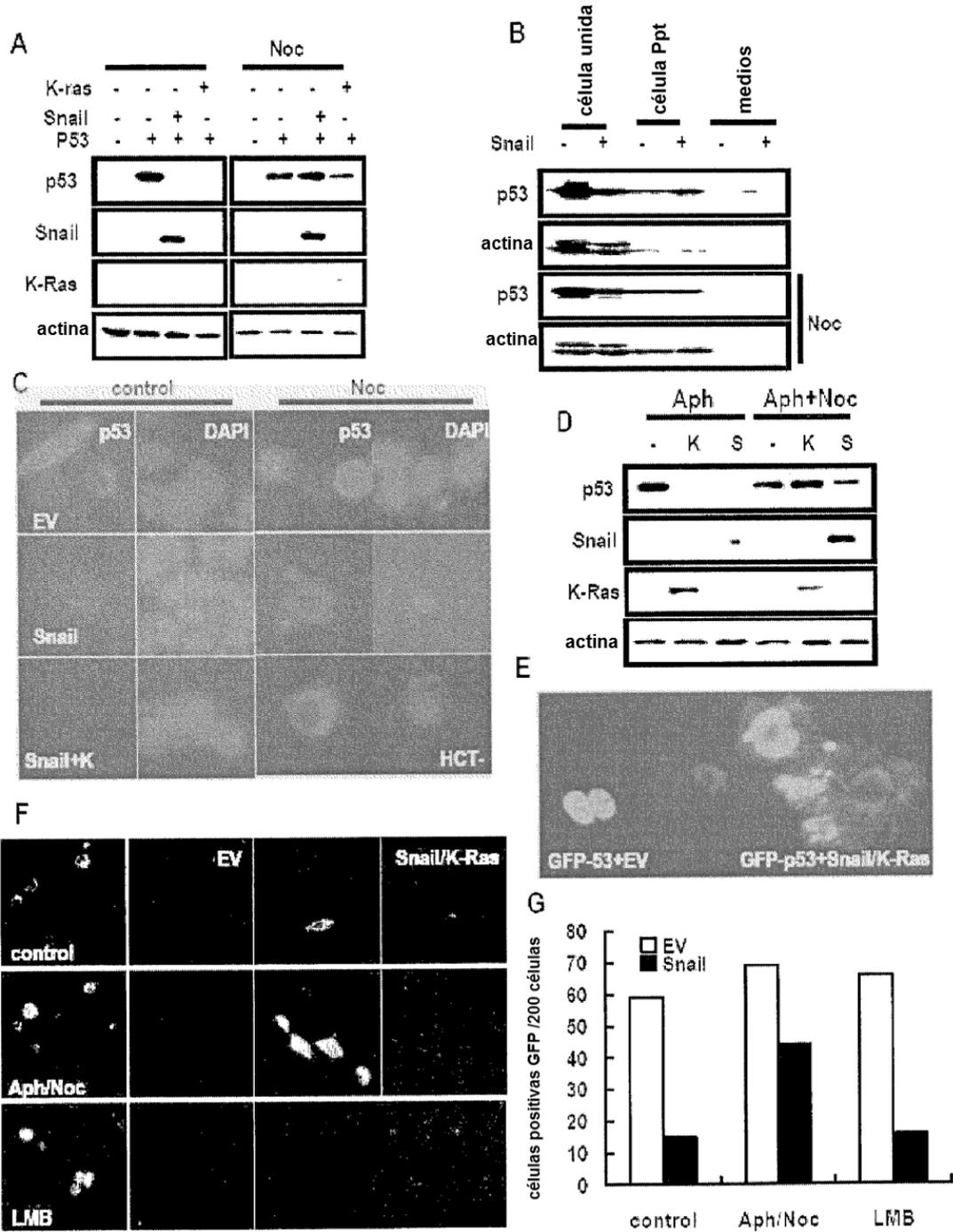
[FIG. 12]



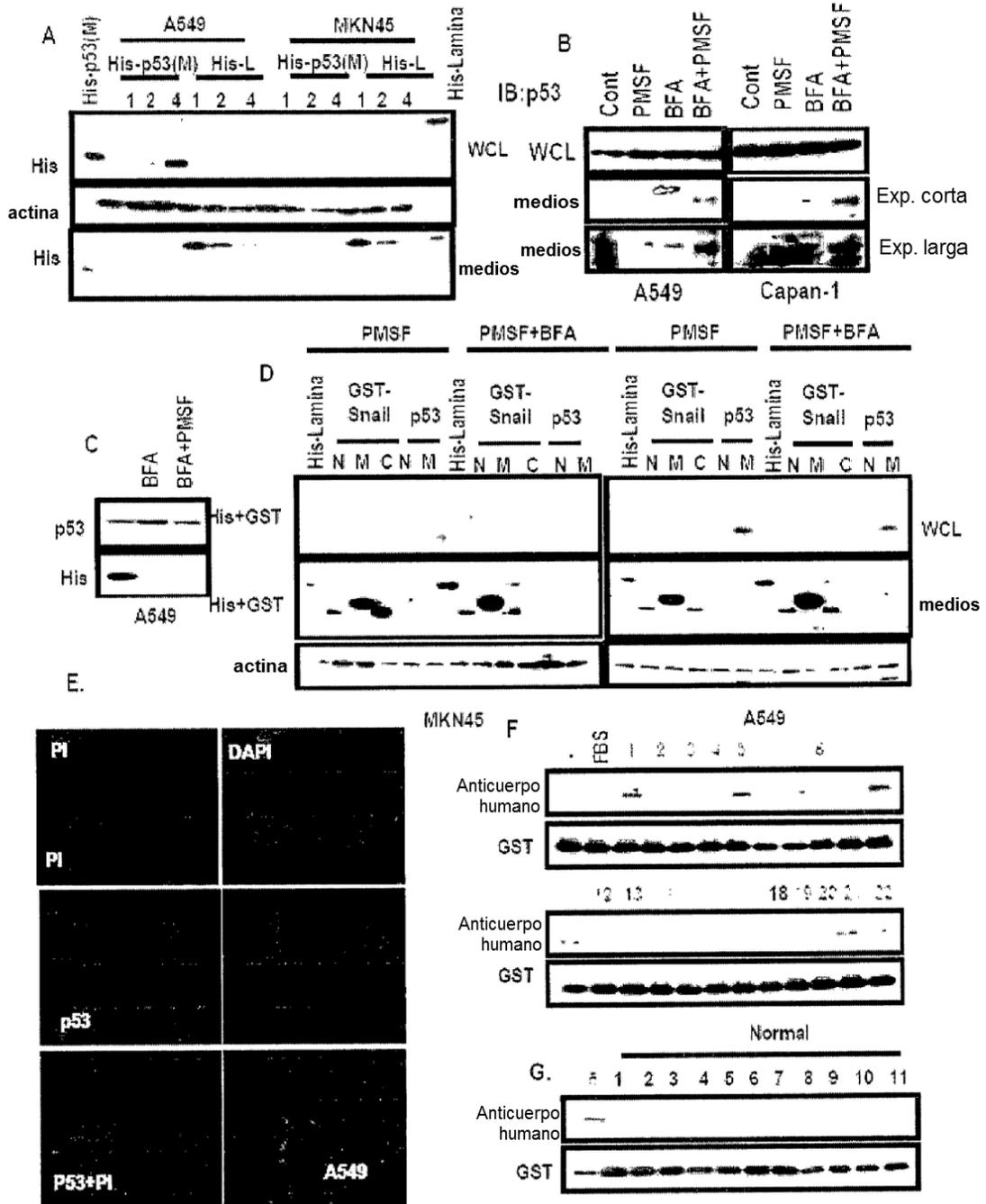
[FIG. 13]



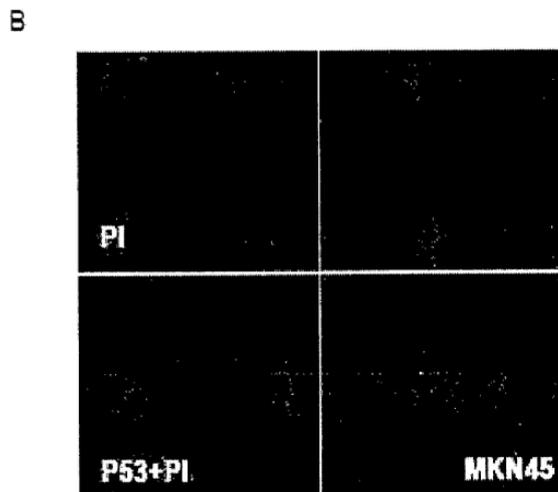
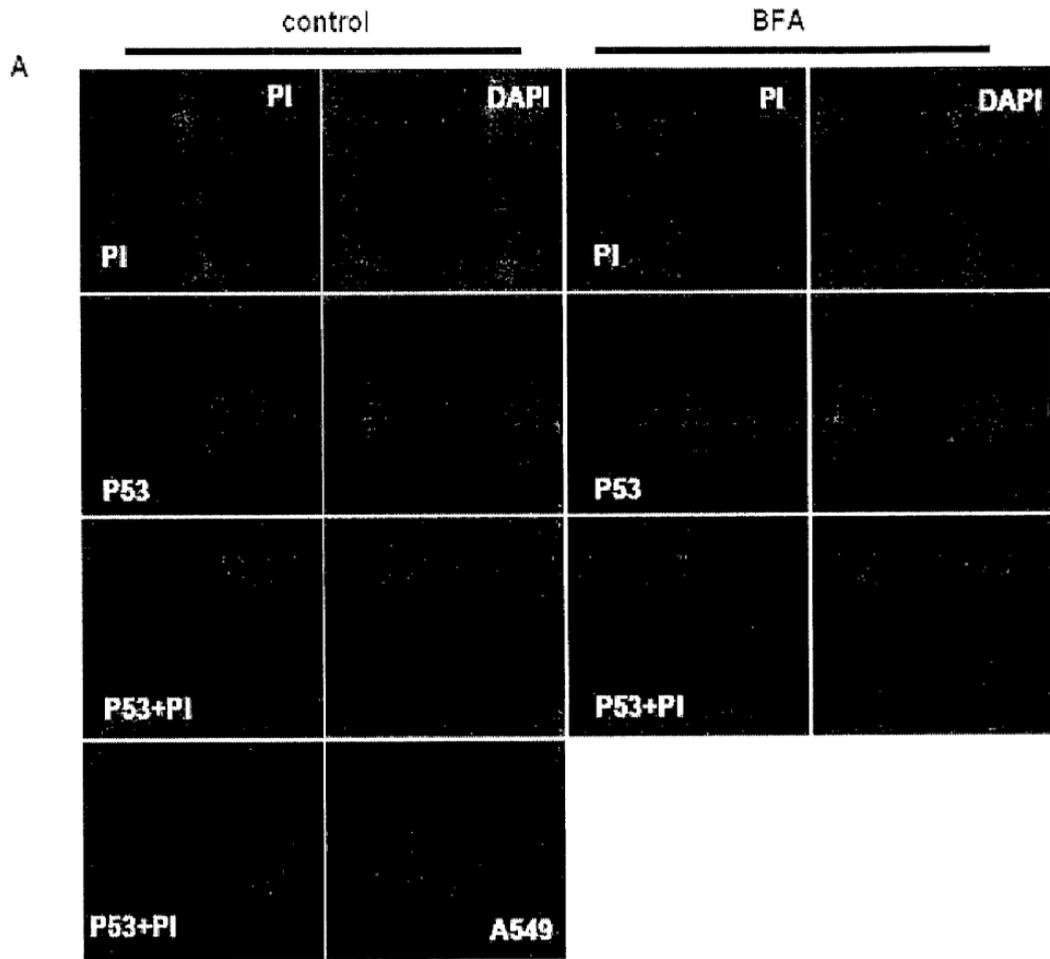
[FIG. 14]



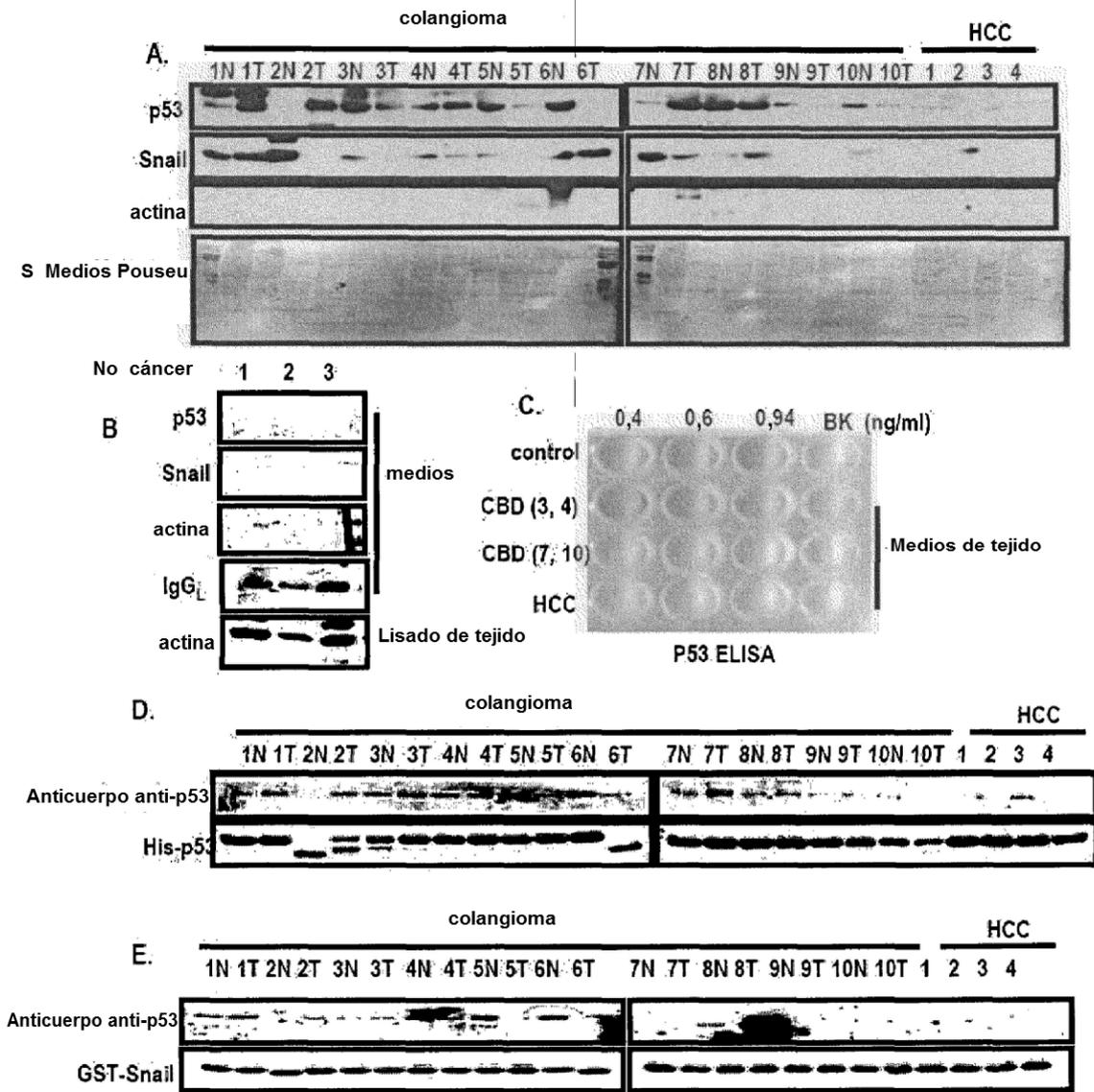
[FIG. 15]



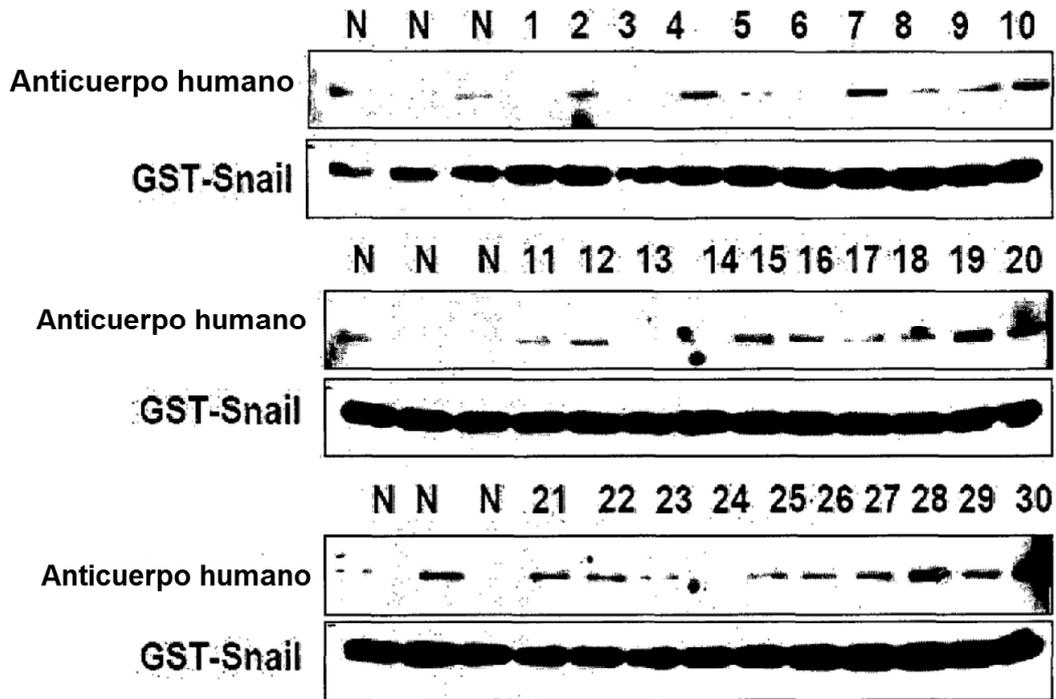
[FIG. 16]



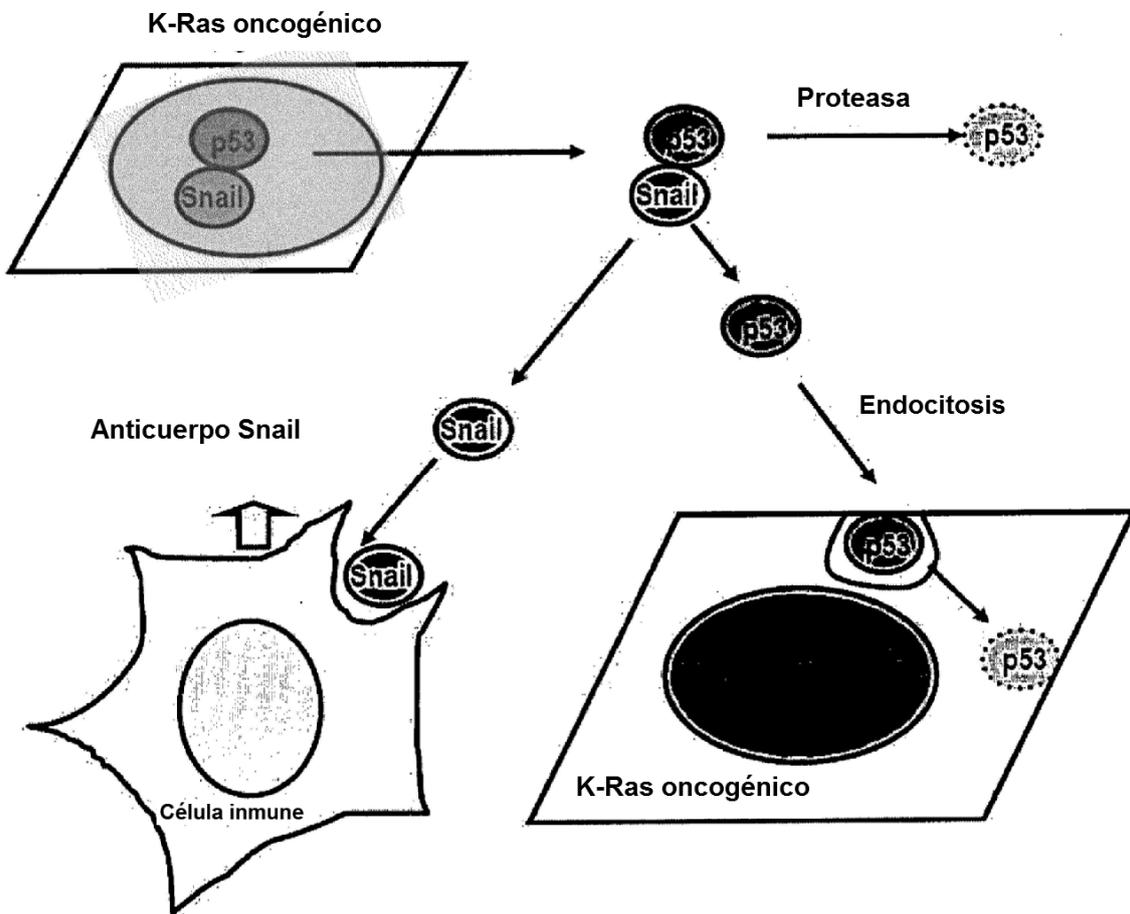
【FIG. 17】



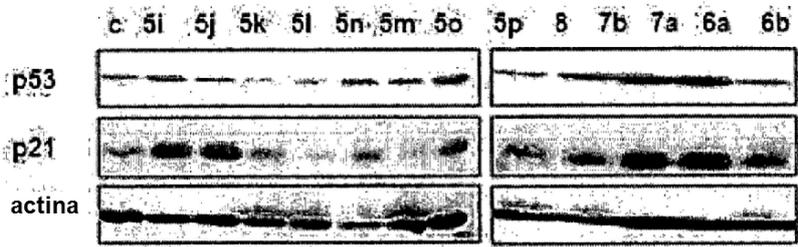
【FIG. 18】



[FIG. 19]

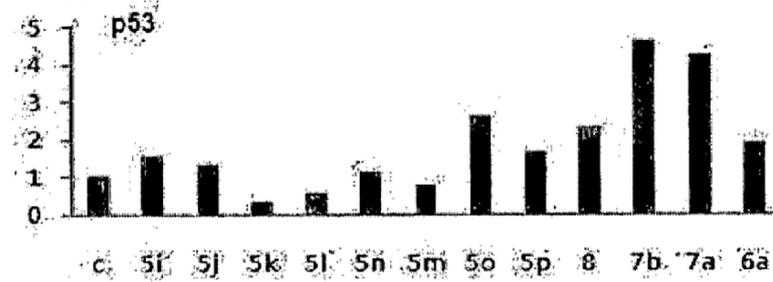


[FIG. 20]

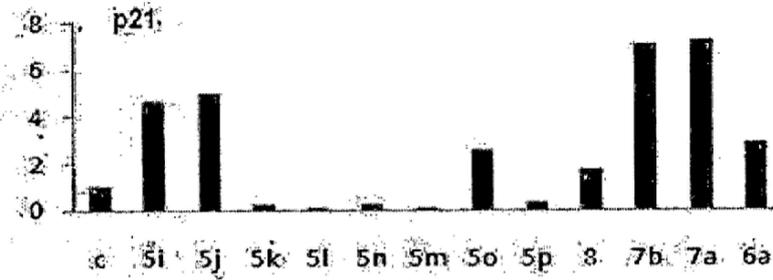


HCT116

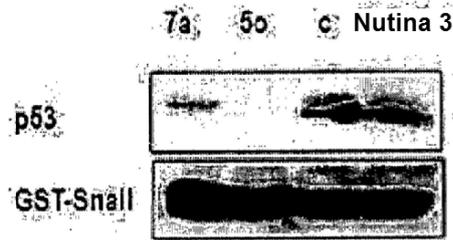
(veces)



(veces)

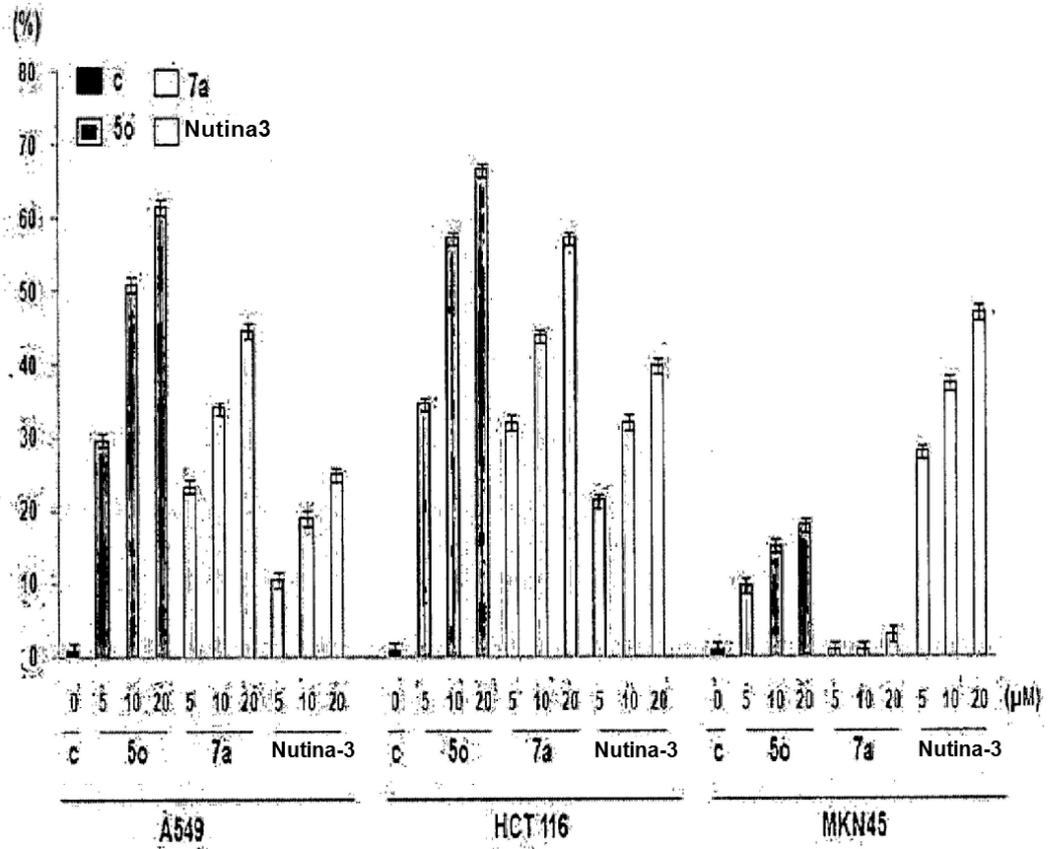


[FIG. 21]

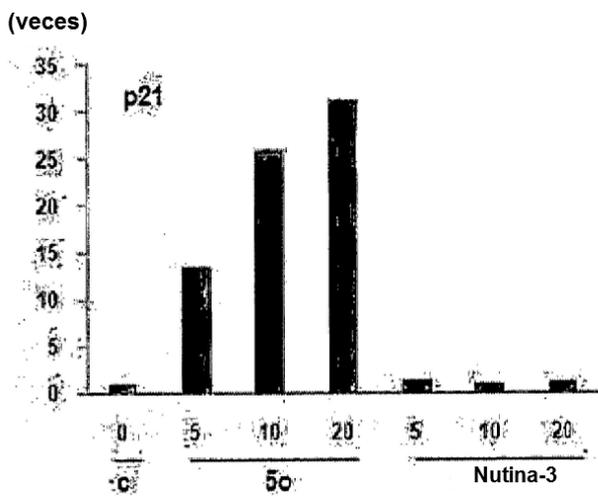


Ensayo GST desplegado

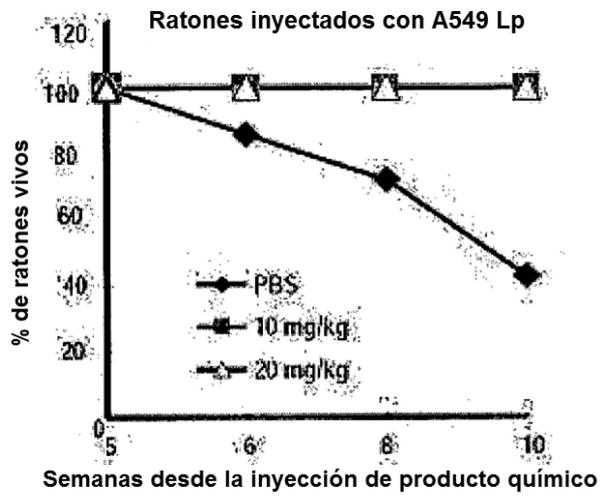
【FIG. 22】



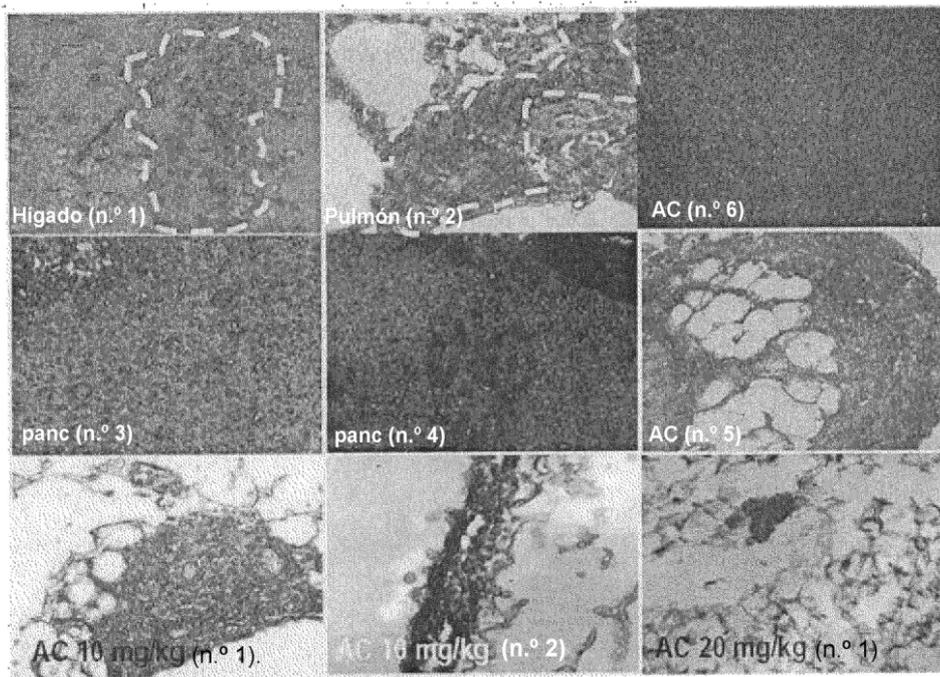
【FIG. 23】



【FIG. 24】

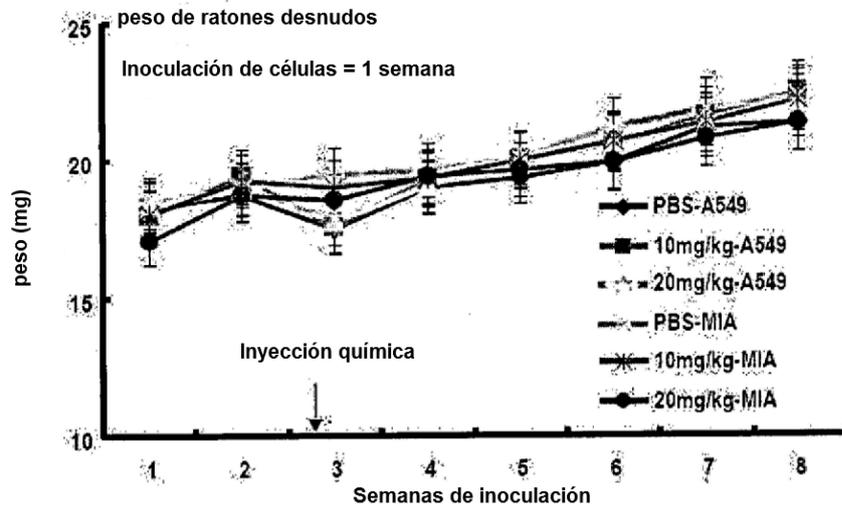


【FIG. 25】



[FIG. 26]

A



B. Inyección 8 semanas

