

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 650**

51 Int. Cl.:

**C07D 493/04** (2006.01)  
**A61K 31/35** (2006.01)  
**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 31/34** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2008.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2015 PCT/KR2015/006701**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16003158**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2015 E 15815478 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3162803**

54 Título: **Nuevo compuesto para inhibir la unión entre la proteína DX2 y la proteína p14/ARF, y composición farmacéutica para tratar o prevenir la enfermedad del cáncer que contiene el mismo como ingrediente efectivo**

30 Prioridad:

**30.06.2014 KR 20140081396**  
**29.06.2015 KR 20150092057**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.04.2020**

73 Titular/es:

**PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-  
UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION  
(50.0%)**  
**2, Busandaehak-ro, 63 beon-gil, Geumjeong-gu  
Busan 609-836, KR y**  
**THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN  
CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**PARK, BUM JOON;**  
**SONG, GYU YONG;**  
**OH, AH-YOUNG;**  
**LEE, JEE-HYUN y**  
**HER, JIN-HYUK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 753 650 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

Nuevo compuesto para inhibir la unión entre la proteína DX2 y la proteína p14/ARF, y composición farmacéutica para tratar o prevenir la enfermedad del cáncer que contiene el mismo como ingrediente efectivo

### Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo compuesto que inhibe la unión entre una proteína DX2 y una proteína p14/ARF, una composición farmacéutica que incluye el nuevo compuesto como un componente efectivo para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa, un adyuvante anticáncer para mejorar un efecto anticáncer de un fármaco anticáncer resistente a los fármacos.

### Técnica antecedente

- 10 El cáncer de pulmón es causado principalmente por carcinógenos, y la incidencia de cáncer de pulmón ha tenido una tendencia creciente en todo el mundo. En Corea del Sur, el cáncer de pulmón que tiene la tasa de mortalidad más alta entre todos los cánceres se considera una de las enfermedades más graves. El cáncer de pulmón se divide en dos grupos, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), y el NSCLC también se divide en subgrupos: adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma de  
15 células grandes y carcinoma adenoescamoso, dependiendo de los tipos de tejido pulmonar. Las manifestaciones clínicas, tales como las áreas propensas a ocurrir dependiendo de los diferentes tipos de tejido pulmonar, el tipo de progresión y la velocidad, y los síntomas, pueden variar, así como los procedimientos de tratamiento.

- La mayoría de los cánceres de pulmón no pueden tratarse con quimioterapia y radioterapia. La quimioterapia y la radioterapia se pueden usar reduciendo un tamaño de SCLC, mientras que no se puede esperar un tratamiento  
20 completo de la quimioterapia y la radioterapia. Dado que un fármaco anticáncer es menos efectivo en NSCLC que en SCLC, el tratamiento del cáncer de pulmón usando solamente quimioterapia es casi imposible. En cambio, la extirpación completa de los tumores de manera quirúrgica es el único tratamiento efectivo. Sin embargo, aproximadamente el 30% o menos de los pacientes con cáncer de pulmón tienen tumores que no se pueden resear por completo cuando se les diagnostica. Además, solo un tercio o menos de los pacientes sobreviven durante 5  
25 años después de la resección quirúrgica.

- Lee, Hyo Jeong et al. : "In vivo Anti-Cancer Activity of Korean Angelica Gigas and its Major Pyranocoumarin Decursin", The American Journal of Chinese Medicine, vol. 37, no. 1, 2009, páginas 127-142 se refiere a un estudio sobre la actividad anticáncer in vivo de la Angelica Gigas coreana y su principal piranocoumarina decursina y concluye que el extracto de la Angelica Gigas Nakai coreana (AGN) poseía una importante actividad anticáncer in vivo, pero la decursina y el angelato de decursinol (DA) solo contribuyeron moderadamente a esa actividad, muy probablemente a través del decursinol.  
30

- Lee, Kyeong et al.: "Synthesis of (S)-(+)-decursin and its analogues as potent inhibitors of melanin formation in B16 murine melanoma cells", European Journal of Medicinal Chemistry, vol. 45, 2010, páginas 5567-5575 se refiere a la síntesis de (S)-(+)-decursina y sus análogos.

- 35 El documento WO 2008/004817 A1 se refiere a novedosos derivados de (+)-decursina que tienen actividad anticáncer, la preparación de los mismos y una composición que los contiene para tratar la enfermedad del cáncer.

Teniendo en cuenta lo anterior, existe una gran demanda de un procedimiento para detectar con mayor precisión el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón y la propagación del cáncer y para tratar de manera más efectiva el cáncer de pulmón.

### 40 Descripción detallada de la invención

#### Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo compuesto que inhiba la unión entre una proteína DX2 y una proteína p14/ARF en consideración del desarrollo de un nuevo compuesto útil para el tratamiento de una enfermedad cancerosa que incluye cáncer de pulmón.

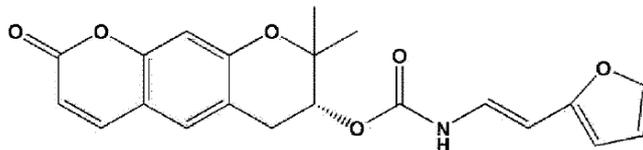
- 45 Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa, incluyendo la composición farmacéutica, como un compuesto efectivo, un compuesto que inhibe la unión entre una proteína DX2 y una proteína p14/ARF.

- Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un adyuvante anticáncer para mejorar el efecto anticáncer de un fármaco anticáncer resistente al fármaco, incluyendo el adyuvante anticáncer, como componente  
50 efectivo, un compuesto que inhibe la unión entre una proteína DX2 y una proteína p14/ARF.

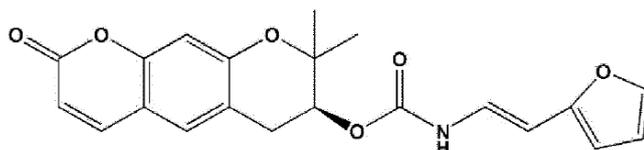
Solución técnica

Para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula 1 o 2 como se define en la reivindicación 1:

[Fórmula 1]

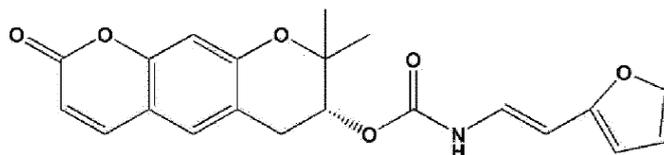


[Fórmula 2]

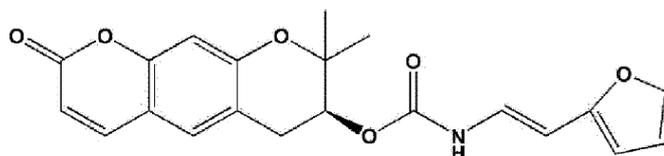


5 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa tal como se define en la reivindicación 3, incluyendo la composición farmacéutica, como componente efectivo, un compuesto representado por la Fórmula 1, 2 o 3:

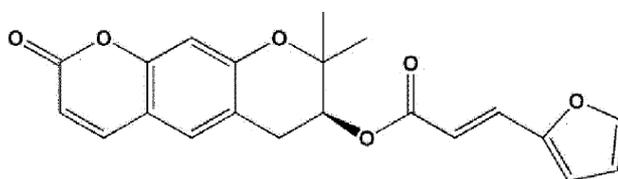
[Fórmula 1]



[Fórmula 2]



[Fórmula 3]



10 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la resistencia al fármaco de un fármaco anticáncer como se define en la reivindicación 7, incluyendo la composición farmacéutica, como componente efectivo, un compuesto representado por la Fórmula 1, 2 o 3.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa como se define en la reivindicación 10, incluyendo la composición farmacéutica, como componentes efectivos, un compuesto representado por la Fórmula 1, 2 o 3 y un fármaco anticáncer.

15 Además, también se describe una composición para diagnosticar cáncer de pulmón, incluyendo la composición una proteína AIMP2-DX2 o un fragmento de la misma.

Además, también se describe un procedimiento para detectar un autoanticuerpo contra una proteína AIMP2-DX2 para proporcionar información para el diagnóstico de cáncer de pulmón, incluyendo el procedimiento: (a) detectar un anticuerpo contra una proteína AIMP2-DX2 a partir de una muestra derivada de un sujeto; y (b) determinar que un sujeto tiene cáncer de pulmón o es susceptible al cáncer de pulmón si una cantidad del anticuerpo detectado en el sujeto aumenta en comparación con una persona normal.

Además, se describe adicionalmente un kit para diagnosticar cáncer de pulmón, incluyendo el kit una proteína AIMP2-DX2 o un fragmento de la misma.

Efectos ventajosos de la invención.

De acuerdo con la presente invención, se puede seleccionar un compuesto que inhiba la interacción de una proteína DX2 con una proteína p14/ARF. Se sintetiza un compuesto análogo al compuesto seleccionado, y una revisión de los efectos anticáncer in vitro e in vivo del compuesto análogo muestra que el compuesto tiene un excelente efecto anticáncer. En particular, en una línea celular que es resistente a un fármaco anticáncer tal como la Adriamicina, se confirma que el compuesto que inhibe la interacción entre una proteína DX2 y una proteína p14/ARF se trata de manera que se inhibe la resistencia de un fármaco anticáncer contra la Adriamicina mientras se mejora el efecto anticáncer del fármaco anticáncer. Por consiguiente, el compuesto divulgado que inhibe la interacción entre una proteína DX2 y una proteína p14/ARF puede usarse significativamente como un fármaco anticáncer o adyuvante anticáncer para una enfermedad cancerosa tal como el cáncer de pulmón.

Además, se describe una composición y un kit, cada uno de los cuales incluye una proteína AIMP2-DX2 o un fragmento de la misma para diagnosticar cáncer de pulmón. La composición y el kit pueden usarse para identificar la incidencia de cáncer de pulmón solamente usando una muestra de suero de un sujeto.

**Descripción de los dibujos.**

La Figura 1 muestra un procedimiento de cribado en base a ELISA para el cribado de un inhibidor específico de DX2 y unión a p14/ARF;

La Figura 2 muestra un efecto inhibitorio de SLCB050 sobre la unión de DX2-p14/ARF, y más particularmente, la Figura 2A muestra los resultados del ensayo desplegable de GST, la Figura 2B muestra los resultados del análisis de inmunoprecipitación, y la Figura 2C muestra los resultados obtenidos al realizar un análisis de unión a proteínas usando una proteína His-DX2 (IP: un grupo que se une a una proteína para precipitación, Sup: un grupo que no se une a una proteína de la que se separa el sobrenadante del precipitado, Entrada: residuos celulares) ;

en la Figura 3, las Figuras 3A a 3C muestran resultados del ensayo desplegable de GST para confirmar la interacción de SLCB050 con una región específica de DX2, y las Figuras 3D y 3E muestran los resultados del ensayo desplegable GST para confirmar los efectos inhibitorios de HJH141204, HJH141206 y SLCB36 en la unión DX2-p14/ARF (PPT: un grupo que se une a una proteína para precipitación, Sup: un grupo que no se une a una proteína del cual se separa el sobrenadante del precipitado);

en la Figura 4, la Figura 4A muestra la disociación de DX2 y p14/ARF después de realizar el tratamiento con SLCB050, la Figura 4B muestra diferencias en la localización de DX2 y p14/ARF después del tratamiento con SLCB050, la Figura 4C muestra los efectos del tratamiento con SLCB050 sobre la línea celular H1299 de NSCLC y la línea celular H69 de SCLC, la Figura 4D muestra los efectos del tratamiento con SLCB050 en células H322 deficientes en p14/ARF;

la Figura 5 muestra la viabilidad de diversas líneas celulares de cáncer de pulmón humano obtenidas después de realizar el tratamiento con SLCB050 en estas.

la Figura 6 muestra los resultados del ensayo de formación de colonias de agar blando obtenido después de que las células H128 que son líneas celulares SCLC se trataron con tratamiento con SLCB050;

la Figura 7 muestra la viabilidad de las células H128 que son líneas celulares SCLC después de que las células fueron tratadas con SLCB050, HJH141204, HJH141206 y SLCB36;

la figura 8 muestra los efectos del tratamiento con SLCB050 sobre la reducción de la resistencia a fármacos de un fármaco anticáncer;

la figura 9 muestra efectos inhibitorios sobre la resistencia al fármaco a la Adriamicina en un modelo de xenoinjerto que usa H446 (Adr: 0,2 µg/ml, SLCB050: 10 mg/kg);

la figura 10 muestra los efectos anticáncer in vivo de SLCB050;

la figura 11 muestra resultados de tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de tejidos pulmonares derivados de ratones DK tratados con SLCB050;

la figura 12 muestra los efectos anticáncer in vivo de SLCB050;

5 la figura 13 muestra el mecanismo de SLCB050 de la presente invención, que es un compuesto que inhibe la unión de DX2-p14/ARF, sobre el efecto terapéutico sobre el cáncer de pulmón;

10 la figura 14 muestra los resultados de la medición de los niveles de expresión de AIMP2-DX2 en diversas líneas celulares de cáncer de pulmón (NSCLC: línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas; SCLC: línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas; H322 y H460: líneas celulares de NSCLC; H146 y H69: líneas celulares de SCLC; AIMP2: proteína 2 multifuncional que interactúa con el complejo de aminoacil tARN sintetasa; y Actina: Actina);

15 la figura 15 muestra los resultados de la medición de los niveles de expresión de AIMP2-DX2 en diversas líneas celulares de cáncer de pulmón (NSCLC: línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas; SCLC: línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas; A549, H1299, H32, H322 y H460: líneas celulares de NSCLC; H146 y H69: líneas celulares de SCLC; AIMP2: proteína 2 multifuncional que interactúa con el complejo de aminoacil tARN sintetasa; GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa);

20 la figura 16 es un diagrama esquemático de un proceso experimental para medir los niveles de autoanticuerpos ATMP2-DX2 en suero de un paciente con SCLC y NSCLC, en el que el proceso experimental consiste en etapas de preparación de una membrana de diagnóstico (etapa 1), que permite una reacción con suero de un paciente (etapa 2), y permitiendo una reacción con anticuerpo antihumano; y

25 la figura 17 muestra los resultados de la medición de los niveles de autoanticuerpos AIMP2-DX2 en suero de un paciente con SCLC y NSCLC (suero normal, N1~N10: suero de una persona normal; suero SCLC, S1~S10: suero de un paciente con SCLC; NSCLC, L1 ~L20: suero de un paciente con NSCLC; Lamina A: lamina A; y el color rojo se refiere a una muestra de la cual se detectaron anticuerpos anti-AIMP2-DX2, mientras que el color negro se refiere a una muestra de la cual no se detectaron anticuerpos anti-AIMP2-DX2 detectado).

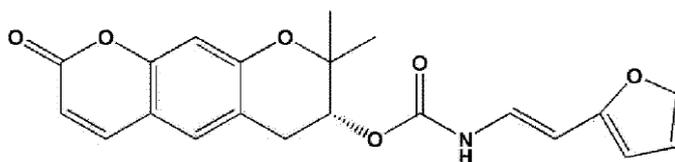
### Mejor modo

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle.

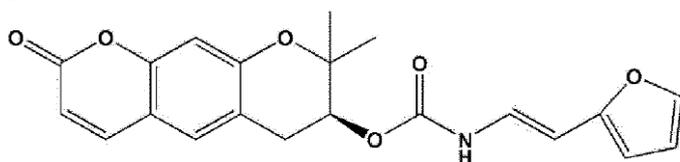
30 La Solicitud de Patente Coreana No. 2014-0113543 divulga que DX2 inhibe la inducción de p14/ARF inducible por carcinógeno, de modo que un inhibidor de unión específico de DX2 y p14/ARF puede usarse como un fármaco anticáncer. A este respecto, la presente invención se completa descubriendo un inhibidor de unión específico de DX2 y p14/ARF y confirmando un efecto anticáncer del inhibidor.

La presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula 1 o 2:

[Fórmula 1]



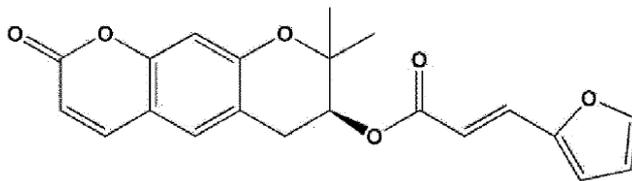
[Fórmula 2]



35 Aquí, el compuesto representado por la Fórmula 1 se nombra como HJH141204, y el compuesto representado por la Fórmula 2 se nombra como HJH141206. Estos compuestos pueden inhibir la unión entre una proteína DX2 y una p14/ARF.

Además, un compuesto representado por la Fórmula 3 se denomina SLCB050.

[Fórmula 3]



En detalle, haciendo referencia a los dibujos, el compuesto de acuerdo con una realización de la presente invención que es un inhibidor de unión específico de DX2 y p14/ARF se seleccionó usando un procedimiento de cribado en base a ELISA de la Figura 1. En base al sistema de reacción de cribado, se midieron los aumentos en los valores de ELISA con concentraciones crecientes de p14/ARF. Sin embargo, en el caso del tratamiento de un inhibidor de unión específico de DX2 y p14/ARF, tal como SLCB050, la reacción ELISA se redujo considerablemente. Por lo tanto, al usar el procedimiento de cribado en base a ELISA, los compuestos que son inhibidores de unión específicos de DX2 y p14/ARF se cribaron principalmente.

La Figura 2A confirma que SLCB050 bloqueó completamente la unión de DX2-p14/ARF a través del ensayo desplegable GST. La Figura 2B confirma que SLCB050 inhibió la interacción de p14/ARF con DX2 en células mediante análisis de inmunoprecipitación. Aquí, se permitió que 293 células contransfectadas reaccionaran con MG132 antes del análisis de inmunoprecipitación para evitar la reducción de dos proteínas, y después de realizar el tratamiento con SLCB050 (10  $\mu$ M, 6 horas), se realizó un ensayo de inmunoprecipitación en las células usando anticuerpos Myc (DX2). La Figura 2C muestra que la unión entre DX2 y AIMP2 se redujo mediante el tratamiento con SLCB050 en un ensayo de unión a proteínas usando la proteína His-DX2, en términos del efecto inhibitorio de SLCB050 sobre la unión entre DX2 y AIMP2. Además, dado que SLCB050 inhibió selectivamente la unión de DX2-p14/ARF como se muestra en la Figura 3A, pero no en la unión de p53-AIMP2 o DX2 como se muestra en la Figura 3B y la unión de p14/ARF como se muestra en la Figura 3C, se confirmó que SLCB050 interactuaría con la región específica de DX2.

Además, HJH141204, HJH141206 y SLCB36, que son compuestos similares a SLCB050, se sintetizaron cada uno, y se realizó el ensayo desplegable de GST para verificar el efecto inhibitorio sobre la unión de DX2-p14/ARF. Como resultado, como se muestra en las Figuras 3D y 3E, SLCB050, HJH141204 y HJH141206 mostraron efectos inhibitorios en la unión de DX2-p14/ARF y no afectaron la interacción de p53-p14/ARF, mientras que SLCB36 no mostró efecto inhibitorio en ambas uniones. Por consiguiente, se confirmó que se requiere la inclusión de una estructura de anillo de ribosa en los compuestos para la inhibición de la unión.

La Figura 4A muestra los resultados obtenidos mediante la detección de la disociación de DX2 y p14/ARF a través de análisis de inmunoprecipitación. Aquí, se transfectaron 293 células con vectores indicadores durante 24 horas y se dejó reaccionar con MG132 y SLCB050 durante 6 horas. La Figura 4B muestra diferencias en la localización de DX2 y p14/ARF después de que las proteínas fueron tratadas con SLCB050. Aquí, la interacción de DX2 con p14/ARF fue bloqueada por el tratamiento con SLCB050 (10  $\mu$ M, 6 horas) de modo que DX2 disminuyó y p14/ARF aumentó en el nucleoplasma. Además, la figura 4C muestra los efectos del tratamiento con SLCB050 sobre la línea celular NSCLC H1299 y la línea celular SCLC H69, y más particularmente, muestra que el tratamiento SLCB050 disminuye DX2, pero aumenta p14/ARF en la línea celular NSCLC H1299 y la línea celular SCLC H69. Además, la figura 4D muestra los efectos del tratamiento con SLCB050 en células H322 deficientes en p14/ARF. Aquí, los niveles de DX2 disminuyeron considerablemente en las células H322 deficientes en p14/ARF en respuesta al tratamiento con SLCB050.

La Figura 5 muestra la viabilidad de diversas líneas celulares de cáncer de pulmón humano después de que las líneas celulares se trataron con SLCB050 durante 24 horas, en donde la viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT. Aquí, las células SCLC fueron muy sensibles a SLCB050.

La Figura 6 muestra los resultados del ensayo de formación de colonias de agar blando. Las células H128 que son líneas celulares SCLC se sembraron en placas de agar blando y se dejaron reaccionar con SLCB050 durante 48 horas, y luego, las células se examinaron después de tefir las células con azul de tripano. SLCB050 redujo el número de colonias de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 7 muestra la viabilidad de las células H128 que son líneas celulares SCLC después de que las células fueron tratadas con SLCB050, HJH141204, HJH141206 y SLCB36. Los tratamientos con SLCB050, HJH141204 y HJH141206 redujeron la viabilidad de las células H128 de una manera dependiente de la dosis, en la que la viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT. Mientras tanto, el tratamiento con SLCB36 no afectó significativamente la viabilidad celular.

La Figura 8 muestra el efecto inhibitorio de SLCB050 sobre la resistencia a fármacos de un fármaco anticáncer contra células expresadas por DX2. La Figura 8A muestra los efectos de SLCB050 sobre la reducción de la resistencia a

los fármacos de un fármaco anticáncer cuando se trata junto con GN25 [5  $\mu$ M, ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxonaftalen-2-iltio)propanoico] y SLCB050 (10 o 20  $\mu$ M), que son activadores de p53, durante 6 horas en DX2 y DK MEFs, en el que los efectos se determinaron por análisis MTT. Aquí, la resistencia a GN25 en las células DX2 y DK fue abolida por el tratamiento con SLCB050, recuperando así los efectos anticáncer de GN25. La Figura 8B muestra los efectos de SLCB050 sobre la reducción de la resistencia al fármaco de las células tumorales primarias de ratones DX2 y DK cuando se tratan junto con Adriamicina (0,2  $\mu$ g/ml) y SLCB050 (10  $\mu$ M) durante 24 horas, en la que los efectos se determinaron por análisis MTT. Aquí, la resistencia a la adriamicina también fue abolida por el tratamiento con SLCB050, recuperando así los efectos anticáncer de la Adriamicina. La Figura 8C muestra la sensibilidad de las líneas celulares SCLC al tratamiento combinacional con Adriamicina y SLCB050. Aquí, la línea celular SCLC H69 respondió parcialmente a SLCB050, de modo que la sensibilidad a Adriamicina mejoró, mientras que las células H322 deficientes en p14/ARF no mostraron una sensibilidad mejorada por el tratamiento combinatorio con SLCB050.

La Figura 9 muestra efectos inhibitorios sobre la resistencia a los fármacos a la adriamicina en un modelo de xenoinjerto que usa H446. La Figura 9A muestra resistencia a Adriamicina en el modelo de xenoinjerto que usa H446, y también muestra resistencia disminuida por el tratamiento con SLCB050. La Figura 9B muestra que el crecimiento tumoral se suprimió en 4 semanas mediante el tratamiento de 5 mg/kg de adriamicina, pero el experimento se interrumpió por la alta toxicidad. En contraste, la dosis baja de adriamicina (2,5 mg/kg) con 10 mg/kg de SLCB050 obviamente suprimió el crecimiento tumoral sin toxicidad severa. La Figura 9C confirmó mediante transferencia Wester que el tratamiento combinatorio con Adriamicina y SLCB050 indujo p53 sinérgicamente en células tumorales primarias.

La Figura 10 muestra los efectos anticáncer in vivo de SLCB050. La Figura 10A muestra un diagrama del programa experimental con ratones DK en términos de examen de los efectos anticáncer in vivo. La Figura 10B muestra resultados de tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de tejidos pulmonares derivados de ratones DK tratados con SLCB050. Aquí, el tratamiento combinacional con Adriamicina y SLCB050 indujo la regresión tumoral. La Figura 10C muestra que el tratamiento combinatorio con Adriamicina y SLCB050 redujo los volúmenes tumorales.

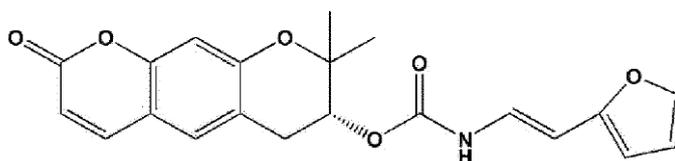
La Figura 11 muestra los resultados de tinción con H-E de tejidos pulmonares derivados de ratones DK tratados con SLCB050. Aquí, las regiones SCLC se borraron más obviamente por el tratamiento combinatorio con Adriamicina y SLCB050.

La Figura 12 muestra los efectos anticáncer in vivo de SLCB050. La Figura 12A es un resultado del análisis de transferencia Western que muestra la reducción de DX2 en respuesta al tratamiento con SLCB050. Las figuras 12B y 12C muestran resultados de tinción con TUNEL de tejidos pulmonares de ratones DK tratados con Adriamicina y SLCB050 en combinación. Aquí, El tratamiento con SLCB050 obviamente aumentó las células tumorales de apoptosis..

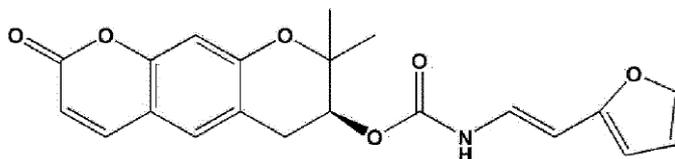
Como se muestra en la Figura 13, los resultados anteriores indican que el DX2 producido por el empalme aberrante de AIMP2 promueve la progresión tumoral, en particular, el cáncer de pulmón de células pequeñas, a través de la interacción directa y la inhibición de p14/ARF. A este respecto, se confirmó que tal cáncer de pulmón de células pequeñas puede tratarse usando compuestos que inhiben la unión de DX2-p14/ARF.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa, incluyendo la composición farmacéutica, como componente efectivo, un compuesto representado por la Fórmula 1, 2 o 3:

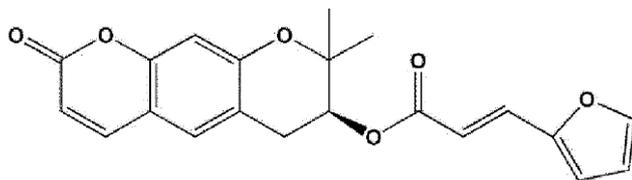
[Fórmula 1]



[Fórmula 2]



[Fórmula 3]



El compuesto anterior puede inhibir la unión entre una proteína DX2 y una proteína p14/ARF.

La enfermedad del cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer cervical uterino, cáncer de endometrio, coriocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, melanoma maligno, linfoma y neoplasia maligna hematológica, y el cáncer de pulmón puede ser cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas, y más preferible, puede ser cáncer de pulmón de células pequeñas.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la resistencia a fármacos de un fármaco anticáncer, incluyendo la composición farmacéutica, como componente efectivo, un compuesto representado por las Fórmulas 1, 2 o 3.

El fármaco anticáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en Adriamicina, Capecitabina, Caboplatin, Cisplatino, Oxaliplatin, Ciclofosfamida, Docetaxel, Paclitaxel, Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Valrubicina, Mitoxantrona, Curcumina, Gefitinib, Erlotinib, Irinotecán, Topotecán, Vinblastina, Vincristina, Gemcitabina, Metotrexato, Trastuzumab, Vinorelbina, Fluorouracilo y ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxonaftalen-2-iltio)propanoico.

El compuesto anterior puede inhibir la unión entre una proteína DX2 y una proteína p14/ARF para inhibir de ese modo la resistencia al fármaco del fármaco anticáncer y mejorar el efecto anticáncer del fármaco anticáncer.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa, incluyendo la composición farmacéutica, como componentes efectivos, un compuesto representado por la Fórmula 1, 2 o 3 y un fármaco anticáncer.

El fármaco anticáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en Adriamicina, Capecitabina, Caboplatin, Cisplatino, Oxaliplatin, Ciclofosfamida, Docetaxel, Paclitaxel, Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Valrubicina, Mitoxantrona, Curcumina, Gefitinib, Erlotinib, Irinotecán, Topotecán, Vinblastina, Vincristina, Gemcitabina, Metotrexato, Trastuzumab, Vinorelbina, Fluorouracilo y ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxonaftalen-2-iltio)propanoico. cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer cervical uterino, cáncer de endometrio, coriocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, melanoma maligno, linfoma y neoplasia maligna

hematológica, y el cáncer de pulmón puede ser cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas, y más preferible, puede ser cáncer de pulmón de células pequeñas.

5 La composición farmacéutica puede incluir, como un inhibidor específico contra la unión entre DX2 y p14/ARF, no solo los compuestos cribados, SLCB050, HJH141204 y HJH141206, sino también un vehículo farmacéuticamente aceptable de los compuestos seleccionados, en una cantidad efectiva. El término "cantidad efectiva" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente para exhibir efectos terapéuticos sobre el cáncer.

10 El vehículo farmacéuticamente aceptable incluido en la composición farmacéutica de la presente invención puede ser cualquier material usado convencionalmente en el momento de la formulación, y los ejemplos del mismo incluyen un compuesto de carbohidrato (por ejemplo, lactosa, amilasa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, celulosa, etc.), goma de acacia, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, solución salina, alcohol, goma arábiga, aceite vegetal (por ejemplo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de coco, etc.), polietilenglicol, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Pero los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable no se limitan a los mismos.

15 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede incluir adicionalmente, además de los componentes descritos anteriormente, un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un agente emulsionante, un agente de suspensión o un conservante. Los materiales adecuados como vehículo y formulación farmacéuticamente aceptables se proporcionan en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

20 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral. En el caso de la administración parenteral, la administración puede realizarse mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea o inyección muscular.

25 Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede variar dependiendo de diversos factores tales como un procedimiento de formulación, un procedimiento de administración, la edad, peso, sexo, condición de enfermedad o dieta de un paciente, tiempo de administración, una ruta de administración, una tasa de excreción y capacidad de respuesta. En general, un médico experto puede determinar y prescribir fácilmente una dosis efectiva en términos de tratamiento o profilaxis deseados. De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, la dosis de la composición farmacéutica puede ser de 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg (peso corporal) por día, y puede administrarse una o varias veces por día.

30 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede prepararse de acuerdo con un procedimiento que pueden llevar a cabo fácilmente los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede prepararse en forma de dosificación unitaria mediante formulación con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, la composición farmacéutica puede prepararse en un recipiente multidosis. Aquí, una formulación de la composición farmacéutica puede ser aceite o solución en un medio acuoso, suspensión o emulsión, extracto, polvo, gránulo, comprimido o cápsula, y puede incluir además un dispersante o un estabilizador.

35 También se describe la composición de TA para diagnosticar el cáncer de pulmón, incluyendo la composición la proteína AIMP2-DX2 o un fragmento de la misma.

40 Los autoanticuerpos contra AIMP2-DX2 se producen en un paciente con cáncer de pulmón, especialmente con cáncer de pulmón de células pequeñas. En este sentido, la detección de autoanticuerpos permite el diagnóstico de cáncer de pulmón. Como procedimiento representativo para detectar los autoanticuerpos, las proteínas objetivo para ser antígenos se inmovilizan en un elemento fijo para luego ser reactivas con una muestra en sangre o suero que incluye anticuerpos extraídos de un sujeto, confirmando así la presencia de unión entre los autoanticuerpos y la muestra.

45 El inventor de la presente invención descubrió la producción de autoanticuerpos contra AIMP2-DX2 en un paciente con cáncer de pulmón y confirmó si los autoanticuerpos contra AIMP2-DX2 se encuentran en el suero de un sujeto después de inmovilizar AIMP2-DX2 en un elemento fijo para la reacción con suero del sujeto. Aquí, los autoanticuerpos contra AIMP2-DX2 no se detectaron en el suero de una persona sana, mientras que los autoanticuerpos se detectaron en un paciente con SCLC o NSCLC.

50 Por lo tanto, AIMP2-DX2 o un fragmento del mismo puede usarse para el diagnóstico de cáncer de pulmón.

AIMP2-DX2 puede ser una variante de delección de AIMP2 que carece del exón 2 de la secuencia AIMP2, y la proteína 2 multifuncional que interactúa con ARS (AIMP2) es una de las proteínas relacionadas con la formación de un compuesto aminoacil-tARN sintetasa (ARS), y es también conocido como p38/JTV-1 o p38.

55 El inventor de la presente invención descubrió en un estudio anterior que, en términos de una nueva función de AIMP2, el colapso genético de AIMP2 indujo la sobreexpresión de c-myc y, en consecuencia, causó hiperproliferación de células epiteliales alveolares en los pulmones, induciendo así la mortalidad neonatal de ratones

neuronales. Además, el inventor de la presente invención descubrió que el AIMP2 inducido por TGF- $\beta$  se mueve hacia el núcleo para inhibir la expresión basándose en el análisis molecular y citológico (MJ Kim, B.-J. Park, Y.-S. Kang, HJ Kim, J.-H. Park, JW Kang, SW Lee, JM Han, H.-W. Lee, S. Kim, Nat. Genet. 34, 330-336, 2003).

5 AIMP2-DX2 puede ser una variante de delección de AIMP2 que carece del exón 2 de la secuencia AIMP2. La secuencia AIMP2 se encuentra en varias bases de datos (versión 312aa: AAC50391.1 o GI: 1215669; versión 320aa: AAH13630.1, GI: 15489023, BC013630.1) y publicaciones (versión 312aa: Nicolaides, N.C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene, Genomics 29 (2), 329-334 (1995)// 320 aa version: Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cADN sequences, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002)). AIMP2-DX2 es una  
10 proteína que carece de una región correspondiente al exón 2 en la secuencia. KR 2004-0078035 divulgado por el mismo inventor de la presente invención divulga la eficacia de la terapia contra el cáncer de AIMP2, y la descripción de AIMP2 en este documento de patente se incorpora aquí como referencia.

15 La proteína AIMP2-DX2 puede incluir una proteína que carece de exón 2 de la secuencia completa de AIMP2 y, a este respecto, también puede incluir una proteína que carece de exón 2 de equivalentes de AIMP2 (equivalentes funcionales que son variantes resultantes de la sustitución, delección, inserción o una combinación de los mismos de la secuencia de aminoácidos de AIMP2, pero tienen una actividad sustancialmente equivalente a AIMP2, o derivados funcionales que tienen modificaciones que mejoran o reducen las propiedades fisicoquímicas o que tienen una actividad sustancialmente equivalente a AIMP2) se elimina.

20 La proteína AIMP2-DX2 puede incluir una proteína en la que la secuencia de aminoácidos que abarca el exón 2 en AIMP2 se elimina por completo, una proteína que incluye las secuencias de aminoácidos del exón 2, de modo que solo una parte de la secuencia de aminoácidos que abarca el exón 2 se elimina del exón 1, exón 3, exón 4 o todos estos exones, una proteína en la que la secuencia de aminoácidos del exón 2 en AIMP2 se elimina parcialmente. Preferiblemente, AIMP2-DX2 puede incluir una proteína en la que la secuencia de aminoácidos que abarca el exón 2 en AIMP2 está completamente eliminada.

25 La proteína AIMP2-DX2 puede incluir no solamente una proteína que tiene secuencias de aminoácidos de origen natural, sino también una variante de secuencias modificadas. La variante de AIMP2-DX2 se refiere a una proteína que tiene una secuencia diferente de una secuencia de aminoácidos de origen natural de AIMP2-DX2 preparada por delección, inserción, sustitución no conservada o conservada, o una combinación de las mismas. La alteración de aminoácidos en proteínas y péptidos donde la actividad molecular no se ve sustancialmente afectada es bien  
30 conocida en la técnica. La alternancia más común incluye alternancia entre residuos de aminoácidos Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly.

En algunos casos, la proteína AIMP2-DX2 puede estar sujeta a modificaciones tales como fosforilación, sulfatación, acrilación, glucosilación, metilación y farnesilación.

35 El fragmento de la proteína AIMP2-DX2 se refiere a un péptido o proteína que incluye una parte de las secuencias de aminoácidos de la proteína AIMP2-DX2. Entonces, cualquier material que tenga una parte de la secuencia de aminoácidos AIMP2-DX2 y una estructura que permita la unión de un anticuerpo específicamente a la proteína AIMP2-DX2 puede usarse como el fragmento de la proteína AIMP2-DX2.

40 AIMP2-DX2 o un fragmento del mismo se puede extraer, sintetizar o preparar de forma natural mediante procedimientos recombinantes basados en secuencias de ADN. Cuando se usa una tecnología de ADN recombinante, un vector de expresión adecuado que porta un ácido nucleico que codifica AIMP2-DX2 se transformó en un vector de expresión recombinante, y se cultivó una célula huésped con el transformante para permitir la expresión de AIMP2-DX2, cubriendo así AIMP2-DX2 del transformante

Preferiblemente, AIMP2-DX2 puede incluir una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 6.

45 El cáncer de pulmón descrito en el presente documento puede incluir tanto cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) como (cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), y preferiblemente, el cáncer de pulmón descrito en este documento puede incluir SCLC.

50 Se describe adicionalmente un procedimiento para detectar un autoanticuerpo contra la proteína AIMP2-DX2 para proporcionar información para el diagnóstico de cáncer de pulmón, incluyendo el procedimiento: (a) detectar un anticuerpo contra AIMP2-DX2 en una muestra derivada de un sujeto; y (b) determinar que un sujeto tiene cáncer de pulmón o es susceptible al cáncer de pulmón en el caso de que una cantidad del anticuerpo detectado en la muestra sea mayor que en una persona normal.

A continuación, el procedimiento se describirá etapa por etapa.

(a) Detectar un anticuerpo contra AIMP2-DX2 a partir de una muestra derivada de un sujeto

En la etapa (a), se detecta un anticuerpo contra la proteína AIMP2-DX2 a partir de una muestra derivada de un sujeto.

La muestra derivada del sujeto se refiere a una sustancia extraída de una persona que desea confirmar si la persona tiene cáncer de pulmón, y los tipos de la sustancia no están particularmente limitados.

- 5 La muestra se refiere, por ejemplo, a una composición obtenida o derivada de un sujeto que desea confirmar si la persona tiene cáncer de pulmón, la composición incluye autoanticuerpos que pueden identificarse en función de características físicas, bioquímicas o fisiológicas.

10 La muestra puede incluir sangre de origen biológico y otras muestras líquidas y tisulares. La fuente de la muestra de tejido puede incluir órganos frescos, congelados y/o preservados o muestras de tejido, tejidos sólidos de biopsia o aspiración, sangre, cualquier componente sanguíneo, fluido corporal y células o suero de cualquier momento durante el embarazo o la embriogenia de un sujeto. La muestra puede incluir sangre entera, células derivadas de sangre, suero, plasma, linfa, sinovia, extracto celular y una combinación de los mismos, pero no se limita a los mismos. Preferiblemente, la muestra puede incluir suero, plasma o suero, o más preferiblemente, suero.

15 El anticuerpo puede ser contra la proteína AIMP2-DX2, y más preferiblemente, puede ser un autoanticuerpo anti-AIMP2-DX2, y más preferiblemente, puede ser una IgG anti-AIMP2-DX2.

20 La detección del anticuerpo contra AIMP2-DX2 puede realizarse preferiblemente mediante la unión antígeno-anticuerpo. Es decir, un anticuerpo se une específicamente a epítomos que son partes bidimensionales a tridimensionales de un antígeno. Por lo tanto, si un antígeno y un anticuerpo pueden unirse inmunológicamente entre sí, se dice que el antígeno y el anticuerpo son "específicos", "reconocibles" o "unidos". El antígeno puede ser preferiblemente proteína AIMP2-DX2 o un fragmento de la misma.

25 La detección del anticuerpo se puede realizar mediante cualquier procedimiento conocido para detectar la presencia de anticuerpo. Sin embargo, tal procedimiento conocido puede ser heterogéneo u homogéneo, secuencial o simultáneo, o competitivo o no competitivo. La detección del anticuerpo se puede realizar de manera cuantitativa para evaluar una concentración o cantidad de autoanticuerpo anti-AIMP2-DX2. Alternativamente, la detección del anticuerpo puede realizarse de manera cualitativa para probar la presencia de autoanticuerpo anti-AIMP2-DX2.

Preferiblemente, la etapa (a) de detectar el anticuerpo contra AIMP2-DX2 a partir de la muestra derivada del sujeto puede incluir: (a1) aplicar la muestra derivada de la muestra a un elemento fijo en el que se inmoviliza AIMP2-DX2 o un fragmento del mismo para permitir una reacción; y (a2) detectar anticuerpos unidos a AIMP2-DX2 en el producto de reacción.

30 La detección del anticuerpo puede realizarse tanto mediante la unión entre un antígeno no inmovilizado y un anticuerpo como de la unión entre un antígeno inmovilizado y un anticuerpo, pero más preferiblemente, puede realizarse mediante la unión entre un antígeno no inmovilizado y un anticuerpo.

35 Es decir, después de que AIMP2-DX2 (antígeno) que es específicamente reactivo a un autoanticuerpo anti-AIMP2-DX2 se une a un elemento fijo (soporte sólido), la muestra derivada del sujeto se mezcla con el producto de reacción para probar la presencia del anticuerpo anti -AIMP2-DX2. Aquí, el antígeno que está en un estado unido con el elemento fijo está en contacto con una muestra biológica que está en un estado no unido, formando así la unión antígeno-anticuerpo. Posteriormente, el elemento fijo se lava de tal manera que la muestra de reacción, incluidos los anticuerpos que no están unidos a los antígenos inmovilizados, se elimine. Después de completar tales tratamientos, se forma un complejo inmune del antígeno y el anticuerpo anti-AIMP2-DX2.

40 La detección puede realizarse mediante, más preferiblemente, un ensayo en sándwich que incluye procedimientos para agregar un conjugado de anticuerpo secundario etiquetado con un marcador detectable (por ejemplo, anticuerpo anti-IgG humano) para formar un complejo de antígeno-anticuerpo de tipo sándwich a través de la inducción de la unión entre el conjugado de anticuerpo secundario y el complejo inmune e identificando el marcador detectable conjugado con el anticuerpo secundario unido al complejo antígeno-anticuerpo de tipo sándwich.

45 El anticuerpo secundario puede incluir un fragmento de inmunoglobulina preparado por recombinación con inmunoglobulinas naturales aisladas de primates no humanos (por ejemplo, anticuerpo de ratón IgG anti-humano, anticuerpo de cabra de IgG anti-humano, etc.) o por síntesis.

50 El marcador conjugado con el anticuerpo secundario puede ser, preferiblemente, un agente colorante convencional que realiza una reacción de color, y ejemplos del marcador incluyen una fluoresceína, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, oro coloidal, . isotiocianato de poli L-lisina-fluoresceína (FITC) y rodamina-B-isotiocianato (RITC), y un tinte.

55 El ensayo en sándwich se divulgó en el documento US 5.876.935, y la identificación del marcador detectable conjugado con el anticuerpo secundario se puede realizar por procedimientos convencionales tales como el ensayo de inmunosorbente enlazado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo en sándwich, transferencia western en gel de poliácridamida, análisis de inmunotransferencia o tinción inmunohistoquímica.

5 Como elemento fijo, se puede usar cualquier soporte sólido ampliamente utilizado como un medio para inmovilizar AIMP2-DX2 o su fragmento. Ejemplos de materiales adecuados para su uso como el elemento fijo incluyen materiales sintéticos, tales como poliestireno, cloruro de polivinilo y poliamida, y otros polímeros sintéticos. Además, tales materiales pueden incluir polímeros naturales, tales como celulosa, o pueden derivarse de polímeros naturales, tales como el acetato de celulosa, nitrocelulosa y vidrio. El elemento fijo puede estar en forma de bola, rama, tubo y placa de microensayo o microtitulación. Además, tales materiales pueden tener una estructura tipo hoja, tal como una tira de papel, una placa pequeña. Y una membrana.

(b) Determinar que un sujeto tiene cáncer de pulmón o es susceptible al cáncer de pulmón en el caso en que una cantidad del anticuerpo detectado en la muestra es mayor que en una persona normal

10 En la etapa (b), se determina que un sujeto con una mayor cantidad de anticuerpos detectados en la etapa (a) en comparación con una cantidad de anticuerpos anti-AIMP2-DX2 en una persona normal tiene cáncer de pulmón o es susceptible al cáncer de pulmón.

La cantidad de anticuerpos detectados en la etapa (a) se refiere a una cantidad de anticuerpos contra la proteína AIMP2-DX2 en la muestra, es decir, una cantidad de autoanticuerpos anti-AIMP2-DX2.

15 Los autoanticuerpos anti-AIMP2-DX2 no se detectan en una persona normal que no tiene cáncer de pulmón, pero sí en un paciente con cáncer de pulmón. En particular, los autoanticuerpos anti-AIMP2-DX2 se detectan significativamente en un paciente con SCLC.

20 Por lo tanto, cuando el nivel de autoanticuerpos contra la proteína AIMP2-DX2 detectado en una muestra de un sujeto es mayor que el de los autoanticuerpos detectados en una muestra de una persona normal, se puede determinar que el sujeto objetivo tiene cáncer de pulmón o es altamente susceptible al pulmón cáncer.

En referencia a las etapas descritas anteriormente, el procedimiento de detección de autoanticuerpos contra la proteína AIMP2-DX2 puede proporcionar información para el diagnóstico de cáncer de pulmón al sujeto objetivo.

25 De acuerdo con una realización, se incubaron diversas líneas celulares SCLC y NSCLC, y se midieron los niveles de transcripción y expresión de AIMP2-DX2. Como resultado, la transcripción y expresión de AIMP2-DX2 en líneas celulares SCLC y NSCLC se confirmaron sin una diferencia en los niveles.

30 De acuerdo con una realización, se aseguró el suero de un paciente con SCLC y NSCLC para medir una cantidad de anticuerpos anti-AIMP2-DX2 en el suero usando una membrana de nitrocelulosa a la que está unida la proteína AIMP2-DX2. En consecuencia, se confirmó que los anticuerpos anti-AIMP2-DX2 no se detectaron en un grupo de control que incluye suero de una persona sana, mientras que los anticuerpos anti-AIMP2-DX2 se detectaron en un paciente con SCLC y NSCLC. En particular, en el caso de un paciente con SCLC, se confirmó que los anticuerpos anti-AIMP2-DX2 se detectan de manera altamente significativa.

Mientras tanto, el kit A se proporciona para diagnosticar el cáncer de pulmón, el kit que incluye la proteína AIMP2-DX2 es un fragmento.

35 El kit puede incluir la proteína AIMP2-DX2 o su fragmento, detecta anticuerpos contra la proteína AIMP2-DX2 en la muestra y permite diagnosticar el cáncer de pulmón de un sujeto.

El kit se caracteriza por incluir la proteína AIMP2-DX2 o un fragmento de la misma, y preferiblemente, se puede proporcionar en una condición fija en un elemento fijo (soporte sólido) en el que se puede fijar AIMP2-DX2 o su fragmento. El elemento fijo puede ser el mismo como se definió anteriormente.

40 Además, el kit puede unirse específicamente a un autoanticuerpo que se une a AIMP2-DX2, y puede incluir además un conjugado de anticuerpo secundario al que se conjuga un marcador detectable. El anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo que se une a un autoanticuerpo (anticuerpo anti-AIMP2-DX2), y preferiblemente, puede ser un anticuerpo anti-IgG humano. El marcador detectable puede ser el mismo como se definió anteriormente.

45 Además, el kit puede incluir además un autoanticuerpo anti-AIMP2-DX2 con una cantidad conocida por adelantado. Tal autoanticuerpo anti-AIMP2-DX2 con una cantidad conocida de antemano puede usarse para establecer una curva estándar para la medición de una cantidad de un autoanticuerpo anti-AIMP2-DX2 con una cantidad desconocida en una muestra derivada de un sujeto.

Además, el kit puede incluir un sustrato adecuado en términos de una reacción antígeno-anticuerpo y el desarrollo del color del marcador, un tampón o similar.

#### Modo de la invención

50 En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle explicando realizaciones preferidas de la invención. Sin embargo, las realizaciones preferidas deben considerarse solo en sentido descriptivo y no con fines de limitación. Se proporcionan realizaciones de la invención para describir más completamente la presente invención a un experto en la técnica.

**<Ejemplo 1> Cribado de un inhibidor de la unión de DX2-p14/ARF**

La presente invención se basa en KR 2014-0113543 divulgada por el inventor de la presente invención. Teniendo en cuenta que DX2 inhibe la inducción de p14/ARF inducible por carcinógeno, de tal manera que un inhibidor de unión específico de DX2 y p14/ARF puede usarse como un fármaco anticáncer, un fármaco anticáncer se cribó de la siguiente manera.

**1. Preparación de la biblioteca de compuestos.**

Los compuestos que se sintetizaron individualmente y la biblioteca de compuestos naturales se prepararon de acuerdo con el documento relacionado (J. Clin. Oncol. 16, 1207-1217, 1998; Nat. Rev. Cancer 2, 489-501, 2002), y se proporcionaron 8.000 compuestos del Korea Chemical Bank para los presentes experimentos.

**2. Análisis ELISA**

Para cribar inhibidores de unión a DX2-p14/ARF, se usó el sistema de cribado en base a ELISA modificado como se muestra en la Figura 1. Es decir, 0,5% de proteínas recombinantes His-DX2 se inmovilizaron en una placa de 96 pocillos con paraformaldehído (PFA). Después de realizar los procedimientos de secado y limpieza, las proteínas GST-p14/ARF se dejaron reaccionar con un compuesto aleatorio (concentración final: 0,1 mM). Después de 1 hora, la placa se lavó usando TBS-T y luego se incubó con anticuerpos anti-GST (1: 10.000, 30 minutos) y anti-ratón-IgG-HRP (1:50.000, 1 hora). Después de realizar un proceso de lavado dos veces, la placa se incubó con solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Calbiochem) y solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N) para una reacción. Posteriormente, mediante el uso de un lector ELISA, los valores se midieron a 450 nm, seleccionando así los fármacos candidatos como inhibidores de unión de DX2-p14/ARF. Aquí, se describe un protocolo más detallado para el presente experimento en el documento relacionado conocido (Nat. Rev. Cancer 2, 489-501, 2002), y se usaron inhibidores de unión de PAK1-Smad4 para excluir fármacos que se confirman como inhibidores comunes.

**3. Ensayos desplegables de proteínas recombinantes, inmunoprecipitación y GST**

A través de los ensayos desplegables de GST, se seleccionaron inhibidores de unión más específicos entre los fármacos candidatos previamente seleccionados como inhibidores de unión de DX2-p14/ARF. Es decir, un fragmento p14/ARF (de longitud completa) se ligó en sitios EcoRI y Hind II del vector pGEX-TEV, que es un vector modificado mediante la adición de un sitio de escisión de proteasa TEV a pGEX-4T1. Las proteínas recombinantes se expresaron luego en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* como proteínas de fusión GST. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con glutatión.

Para abordar la unión directa entre las dos proteínas, se incubó GST conjugada con perlas de agarosa (control negativo) o proteína objetivo GST con lisado celular o proteína recombinante en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (NaCl, 25 mM Tris-Cl, 1% NP-40, 1% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS, mezcla de inhibidor de proteasa) durante 1 hora a una temperatura de 4 °C para una reacción.

El ensayo de inmunoprecipitación (IP) se realizó con lisado celular o proteína recombinante con tampón RIPA. Los lisados enteros se incubaron con anticuerpos adecuados durante 2 horas a una temperatura de 4 °C para una reacción, y luego, las mezclas se agregaron con anticuerpo secundario conjugado con perlas A/G-agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 2 horas. Después de la incubación para una reacción, las mezclas se lavaron usando tampón RIPA dos veces, y las proteínas precipitadas se determinaron mediante análisis de transferencia Wester.

**4. Análisis de transferencia Western**

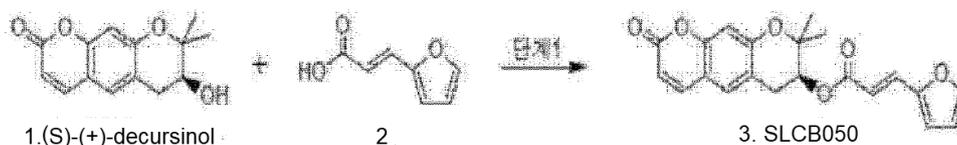
Para llevar a cabo el análisis de transferencia Western, las proteínas se inactivaron térmicamente en tampón RIPA (tratamiento térmico durante 7 minutos a una temperatura de 95 °C), y luego, las proteínas resultantes se aplicaron a SDS-PAGE, seguido de un análisis de transferencia Western de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica (J. Clin. Oncol. 16, 1207-1217, 1998; Nat. Rev. Cancer 2, 489-501, 2002). Los anticuerpos utilizados en este documento, por ejemplo, HA (sc-7392), His (sc-8036), GFP (sc-9996), GST (sc-138), Actina (sc-1616) y p19/ARF (sc-32748), se adquirieron de Santa Cruz Biochnology, anti-p14/ARF (MAB3782) se adquirió de Millipore, y FLAG-M2 y anti-C-Myc (M5546) se adquirieron de Sigma Aldrich. Además, el Profesor Kim, Sung-Hoon (Seúl Nat. Univ.) proporcionó anti-AIMP2.

**5. Cribado del inhibidor de unión de DX2-p14/ARF**

Como se muestra en las Figuras 2A, 2B y 3A, se obtuvo SLCB050 como un compuesto que inhibe selectivamente la unión de DX2-p14/ARF. En particular, SLCB050 solo bloqueó la interacción de DX2 y AIMP2 como se muestra en la Figura 2C, pero no en la unión de p53-AIMP2 o DX2 como se muestra en la Figura 3B y p14/ARF como se muestra en la Figura 3C. A este respecto, se confirmó que SLCB050 interactuaría con la región específica de DX2.

<Síntesis de SLCB050 [ácido (7S)-(+)-3-(2-furanil)-acrílico, 8,8-dimetil-2-oxo-6,7-dihidro-2H, 8H-pirano[3,2-g]cromen-7-il-éster]>

[Fórmula de reacción 1]



[Etapa 1]

Bajo gas N<sub>2</sub>, se agregaron ácido trans-3-(2-furanil)acrílico (560 mg, 4,06 mmol, 1eq), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 1,17 g, 6,09 mmol, 1,5 eq) y 4-(dimetilamino)piridina (4-DMAP, 198 mg, 1,62 mmol, 0,4 eq) a un matraz de fondo redondo de 100 ml y luego se disolvieron en diclorometano anhidro (100 ml). Se añadió (S)-(+)-decursinol (1 g, 4,06 mmol, 1 eq, KR 0715206) a la solución mixta, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 5 horas y concentrado bajo presión reducida. El filtrado se separó luego mediante una columna de sílica gel (acetato de etilo: n-hexano = gradiente de elución a 1:3 de 1:8), obteniendo de este modo ácido (7S)-(+)-3-(2-furanil)-acrílico, 8,8-dimetil-2-oxo-6,7-dihidro-2H,8H-pirano[3,2-g]cromen-7-il-éster (SLCB050) que tiene las siguientes propiedades materiales:

rendimiento: 73,6 %; fase sólida de color naranja; pf: 96,1 °C; R<sub>f</sub>: 0,62 (n-hexano:acetato de etilo =1:1); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +62,4 (c=3, CHCl<sub>3</sub>);

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 7,64(1H, s, H-6'), 7,58(1H, d, J = 9,6Hz, H-4), 7,56(1H, d, J = 16,0Hz, H-3'), 7,41(1H, d, J = 1,6Hz, H-7'), 7,17(1H, s, H-5), 6,82(1H, s, H-10), 6,55(1H, d, J = 1,6Hz, H-8'), 6,23(1H, d, J = 9,6Hz, H-3), 6,13(1H, d, J = 16,0Hz, H-2'), 5,17(1H, t, J = 4,4Hz, H-7), 3,23(1H, dd, J = 4,4, 17,6Hz, H-6a), 2,92(1H, dd, J = 4,4, 17,6Hz, H-6b), 1,42(3H, s, CH<sub>3</sub>-8), 1,38(3H, s, CH<sub>3</sub>-8);

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 166,3(C-1'), 161,3(C-2), 156,3(C-9a), 154,1(C-10a), 144,8(C-4'), 144,5(C-6'), 143,1(C-4), 135,8(C-3'), 128,7(C-5), 117,0(C-2'), 115,6(C-5a), 113,3(C-3), 112,9(C-7'), 112,9(C-4a), 107,2(C-8'), 104,7(C-10), 76,6(C-8), 70,0(C-7), 27,8(C-6), 24,8(CH<sub>3</sub>-8), 23,3(CH<sub>3</sub>-8); y

ESI-MS: m/z = 389 [M+Na]<sup>+</sup>.

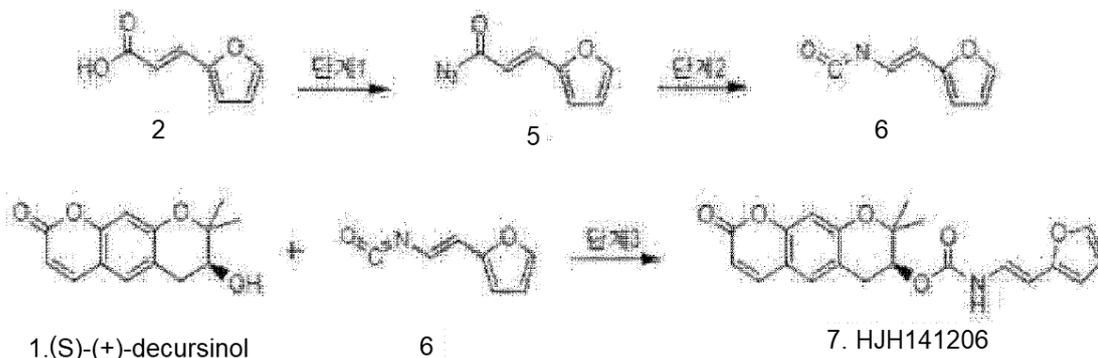
6. Síntesis de HJH141204 y HJH141206

Como compuestos análogos al SLCB050 previamente seleccionado, HJH141204, HJH141206 y SLCB36 se sintetizaron cada uno.

Como se muestra en las Figuras 3D y 3E, SLCB050, HJH141204 y HJH141206 mostraron efectos inhibitorios sobre la unión de DX2-p14/ARF y no afectaron la interacción de p53-p14/ARF, mientras que SLCB36 no mostró efecto inhibitorio sobre ambas uniones. Por consiguiente, se confirmó que se requiere la inclusión de una estructura de anillo de ribosa en los compuestos para la inhibición de la unión.

1) Síntesis de HJH141206: ácido (7S)-(+)-2-(furan-2-il)vinilcarbámico, 8,8-dimetil-2-oxo-6,7-dihidro-2H,8H-pirano[3,2-g] cromen-7-il-éster

[Fórmula de reacción 2]



[Etapa 1] Se disolvió ácido trans-3-(2-furanil)acrílico (500 mg, 3,37 mmol) en 20 ml de benceno seco en un matraz de fondo redondo, y luego, trietilamina (TEA, 234  $\mu$ l, 1,683 mmol) y se añadieron al mismo difenilfosforilazida (DPPA, 362  $\mu$ l, 1,683 mmol) para una reacción a una temperatura de 80 °C durante 3 horas. Después de realizar un proceso de extracción usando agua y acetato de etilo en la solución mixta, se realizó un proceso de deshidratación usando sulfato de sodio, seguido de concentración bajo presión reducida.

[Etapa 2] El producto resultante se disolvió nuevamente en benceno seco, y luego, se calentó hasta reflujo a una temperatura de 80 °C durante un día.

[Etapa 3] se añadió (S)-(+)-decursinol (207 mg, 0,841 mmol) al mismo, y se añadieron TEA (281  $\mu$ l, 2,019 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 82 mg, 0,673 mmol) también añadido a esto para una reacción a una temperatura de 80 °C durante 3 horas. La solución de reacción se concentró bajo presión reducida, y el filtrado se separó luego por columna de sílica gel (acetato de etilo: n-hexano = gradiente de elución a 1:3 de 1: 8), obteniendo de este modo ácido (7S)-(+)- 2-(furan-2-il)vinilcarbámico, 8,8-dimetil-2-oxo-6,7-dihidro-2H, 8H-pirano[3,2-g]cromen-7-il-éster (HJH141206) que tiene las siguientes propiedades del material:

rendimiento: 69,7%; fase sólida de color marrón; pf: 58,5 °C;  $R_f = 0,46$  (n-hexano:acetato de etilo=1:1);  $[\alpha]_D^{25} +79,6933$  (c=3,  $\text{CHCl}_3$ );

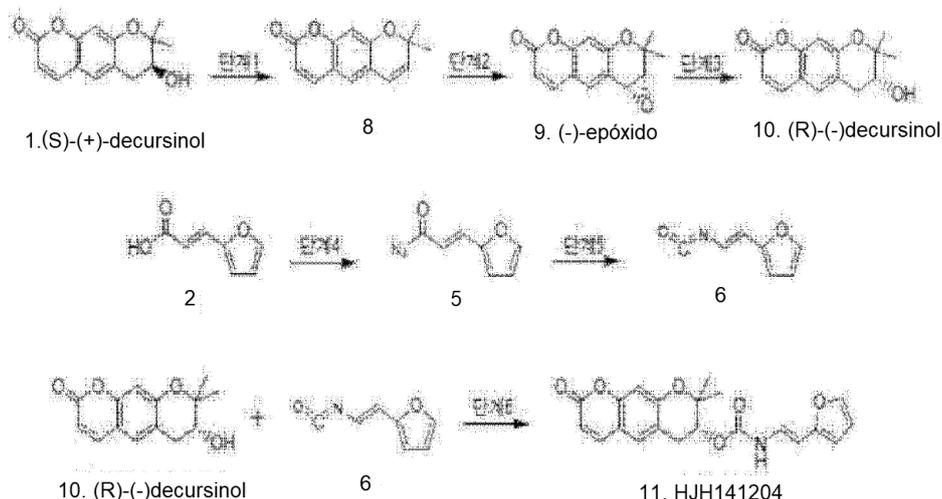
$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta_H$  9,894(d,  $J = 10,2\text{Hz}$ , 1H), 7,920(d,  $J = 9,6\text{Hz}$ , 1H), 7,493(s, 2H), 6,984(dd,  $J = 10,2, 14,7\text{Hz}$ , 1H), 6,798(s, 1H), 6,401-6,383(m, 1H), 6,264(d,  $J = 9,6\text{Hz}$ , 1H), 6,190(d,  $J = 3,3$ , 1H), 5,912(d,  $J = 14,4\text{Hz}$ , 1H), 5,056(t,  $J = 3,6\text{Hz}$ , 1H), 3,254(dd,  $J = 4,2, 18,0\text{Hz}$ , 1H), 2,917(dd,  $J = 3,3, 17,7\text{Hz}$ , 1H), 1,384(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,313(s, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta_C$  160,3, 155,8, 153,5, 153,1, 151,5, 144,1, 141,1, 129,6, 123,9, 115,7, 112,7, 112,6, 111,5, 105,2, 103,5, 99,9, 76,8, 70,2, 27,3, 24,3, 23,7; y

ESI-MS:  $m/z = 382$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,

2) Síntesis de HJH141204: ácido (7R)-(-)-2-(furan-2-il)vinilcarbámico, 8,8-dimetil-2-oxo-6,7-dihidro-2H,8H-pirano[3, 2-g]cromen-7-il-éster

[Fórmula de reacción 3]



[Etapa 1] Como se muestra en la fórmula de reacción anterior, se añadieron (+)-decursinol (1, 85 g, 0,35 mol) y trifetilfosfina (226 g, 0,87 mol) a un matraz de fondo redondo y acetonitrilo (600 ml) y tetracloruro de carbono (600 ml) se disolvieron en el mismo en una proporción de 1:1. Luego, la solución mezclada se sometió a reflujo a temperaturas de 50-60 °C durante 2 horas. Aproximadamente la mitad del filtrado se concentró bajo presión reducida, luego se separó mediante una columna de sílica gel, obteniéndose así 8,8-dimetil-8H-pirano[3,2-g]cromen-2-ona (8) como muestra en el experimento que tiene las siguientes propiedades materiales:

rendimiento: 98,6%; fase sólida blanca; p.f: 124 °C;  $R_f=0,62$  (n-hexano:acetato de etilo=1:1);

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_H$  7,583(d,  $J = 9,52\text{Hz}$ , 1H), 7,049 (s, 1H), 6,711(s, 1H), 6,340(d,  $J = 10,0\text{Hz}$ , 1H), 6,213(d,  $J = 9,52\text{Hz}$ , 1H), 5,691(d,  $J = 9,76\text{Hz}$ , 1H), 1,467(s, 6H,  $\text{CH}_3 \times 2$ ); y

ESI-MS:  $m/z = 229 [M+H]^+$ ,

[Etapa 2] Se añadieron hipoclorito de sodio al 15% (60 ml) y fosfato de sodio dibásico 0,05 M (24 ml) a un matraz de fondo redondo, y la solución de reacción se ajustó usando solución de hidróxido de sodio 1N o solución de hidrocloreuro 1N para tener un pH de 11,3. Luego, a la solución de reacción, se agregó una solución en la cual se disolvieron 8,8-dimetil-8H-pirano[3,2-g]cromen-2-on (8, 1,3 g, 5,7 mmol) y cloruro de (R,R)-(-),N,N'-bis(3,5-di-tert-butilsalicilideno)-1,2,-ciclohexanodiamino-manganeso (III) (catalizador Jacobsen, 69,9 mg, 0,11 mmol) en diclorometano (15 ml). La solución de reacción mixta se agitó a una temperatura de 0°C durante aproximadamente 7 horas. Se realizó un proceso de extracción en la solución de reacción mixta usando diclorometano, y una capa orgánica obtenida a partir de la misma se lavó con agua, en la que la capa orgánica era de color marrón rojizo. Después de secar la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, el filtrado se concentró bajo presión reducida. Para obtener productos puros, la solución concentrada se separó mediante una columna de sílica gel, obteniendo así (6R, 7R)-6,7-epoxi-8,8-dimetil-6H-pirano [3,2-g]cromen-2-on (9) que tiene las siguientes propiedades materiales:

rendimiento: 56,3%; fase sólida blanca; p.f.:145,2 °C;  $R_f=0,32$ (n-hexano: acetato de etilo=1:1);  $[\alpha]_D^{25} +201,8$ (c=3, CHCl<sub>3</sub>);

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,643(d,  $J = 9,52$ Hz, 1H), 7,470(s, 1H), 6,754(s, 1H), 1H), 6,265(d,  $J = 9,52$  Hz, 1H), 3,976(d,  $J = 3,88$ Hz, 1H), 3,551(d,  $J = 3,88$ Hz, 1H), 1,609(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,312(s, 3H, CH<sub>3</sub>); y

ESI-MS:  $m/z = 245 [M+H]^+$ ,

[Etapa 3] Como se muestra en la fórmula de reacción anterior, (6R,7S)-6,7-epoxi-8,8-dimetil-6H-pirano [3,2-g]cromen-2-on (9, 600 mg, 2,456 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano en un matraz de fondo redondo. Luego, se añadieron cianoborohidruro de sodio y dietil eterato de trifluoruro de borano. La solución de reacción mixta se agitó a una temperatura de 0°C durante 30 minutos. El filtrado de la solución de reacción mixta se concentró bajo presión reducida, seguido de ser separado por una columna de sílica gel, obteniendo así (-)- decursinol[decursinol; (7R)-7-hidroxi-8,8-dimetil-8H-pirano[3,2-g]cromen-2-on (10)] como muestra en el experimento que tiene las siguientes propiedades de material:

rendimiento: 98,6 %; fase sólida blanca; p.f.:135,6 °C;  $R_f=0,179$ (n-hexano:acetato de etilo=1:1);  $[\alpha]_D^{25} -18,4$ (c=4, CHCl<sub>3</sub>);

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  7,579(d,  $J = 9,5$ Hz, 1H), 7,180(s, 1H), 6,780(s, 1H), 6,219(d,  $J = 9,52$ Hz, 1H), 3,876(d,  $J = 5,1$ Hz, 1H), 3,112(dd,  $J = 4,8$ Hz, 16,7Hz, 1H), 2,837(dd,  $J = 5,6$ Hz, 16,6Hz, 1H), 1,397(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,367(s, 3H, CH<sub>3</sub>); y

ESI-MS:  $m/z = 247 [M+H]^+$ ,

[Etapa 4] Se disolvió ácido trans-3-(2-furanil)acrílico (500 mg, 3,37 mmol) en 20 ml de benceno seco en un matraz de fondo redondo, y luego, TEA (234  $\mu$ l, 1,683 mmol) y DPPA (362  $\mu$ l, 1,683 mmol) se añadieron a la misma para una reacción a una temperatura de 80 °C durante 3 horas. Después se realizó de un proceso de extracción usando agua y acetato de etilo en la solución mixta, se realizó un proceso de deshidratación con sulfato de sodio sobre el mismo, seguido de concentración bajo presión reducida.

[Etapa 5] El producto resultante se disolvió nuevamente en benceno seco, y luego, se calentó a reflujo a una temperatura de 80 °C durante un día.

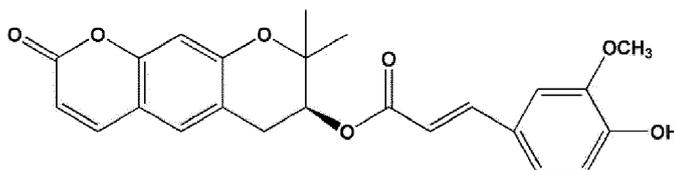
[Etapa 6] Se agregó (-)-decursinol (207 mg, 0,841 mmol) sintetizado en la etapa 3 se agregó a la misma, y se agregó TEA (281  $\mu$ l, 2,019 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 82 mg, 0,673 mmol) a la misma para una reacción a una temperatura de 80 °C durante 3 horas. La solución de reacción se concentró [bajo presión reducida, y el filtrado se separó luego por columna de sílica gel (acetato de etilo: n-hexano = gradiente de elución a 1:3 de 1:8), obteniendo de este modo ácido (7R)-(-)-2-(furan-2-il)vinilcarbámico, 8,8-dimetil-2-oxo-6,7-dihidro-2H, 8H-pirano[3,2-g]cromen-7-il-éster (HJH141204) como una muestra en el experimento que tiene las siguientes propiedades de material:

rendimiento: 80,9 %; fase sólida de color marrón; p.f.: 58,1 °C;  $R_f = 0,46$  (n-hexano:acetato de etilo=1:1);  $[\alpha]_D^{25} -79,6467$  (c=3, CHCl<sub>3</sub>);

<sup>1</sup>HRMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 9,896(d,  $J = 10,2$ Hz, 1H), 7,902(d,  $J = 9,6$ Hz, 1H), 7,477(s, 2H), 6,992(dd,  $J = 10,2, 14,4$ Hz, 1H), 6,790(s, 1H), 6,396-6,387(m, 1H), 6,255(d,  $J = 9,6$ Hz, 1H), 6,185(d,  $J = 3,3$ Hz, 1H), 5,919(d,  $J = 14,4$ Hz, 1H), 5,059(t,  $J = 3,7$ Hz, 1H), 3,251(dd,  $J = 4,2, 18,0$ Hz, 1H), 2,922(dd,  $J = 3,3, 18,0$ Hz, 1H), 1,384(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,313(s, 3H, CH<sub>3</sub>);

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta_C$  160,3, 155,9, 153,6, 153,2, 151,6, 144,0, 141,1, 129,6, 124,0, 115,7, 112,7, 112,6, 111,5, 105,2, 103,5, 100,0, 76,9, 70,3, 27,3, 24,3, 23,7; y

ESI-MS:  $m/z = 382 [M+H]^+$ .

**3) Compuesto SLCB36:****<Ejemplo 2> Evaluación del efecto anticáncer****5 1. Cultivo celular**

Las líneas celulares A549, HCT116, H1299 y HEK293 se adquirieron cada una de la colección de cultivos de American Type (ATCC, Manassas, VA), y se cultivaron en medio RPMI-1640 o medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) ) y 1% de antibióticos. Las líneas celulares de NSCLC (NCI-H23, NCI-H322, NCI-H358 y NCI-H460) adquiridas de líneas celulares ATCC y SCLC (NCI-H69, NCI-H128m y NCI-H146) adquiridas en el Banco de líneas celulares coreanas (KCLB, Seúl, Corea) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS. Se aislaron células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) a partir de embriones de 14,5 días usando un protocolo estándar y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 15% de FBS y 1% de antibióticos.

**2. Preparación de ratones**

15 Todos los procedimientos experimentales con animales de laboratorio fueron aprobados por el comité de cuidado animal de la Universidad Nacional de Pusan. Los ratones DX2 (C57/BL6) y K-RasLA2 (C57/BL6) se obtuvieron del Dr. Kim, Sung-Hoon y el Profesor Choi, Kang-Ryeol (Universidad de Yonsei), respectivamente, y ratones Tg dobles se obtuvieron mediante cruzamiento de ratones DX2 y K-RasLA2. Antes del experimento, todos los ratones se mantuvieron bajo condiciones de temperatura y luz controladas (20-23 °C, 12 h/12 h ciclo claro/oscuras), y se les proporcionó agua y alimentos en autoclave.

**3. Ensayos desplegables de proteínas recombinantes, inmunoprecipitación y GST**

De la misma manera que en el Ejemplo 1, se realizaron proteínas recombinantes, ensayo de IP, ensayo desplegable de GST y análisis de transferencia Western.

**4. Ensayo MTT**

25 Mediante el ensayo MTT, los efectos anticáncer se confirmaron en base a la viabilidad de las células tumorales. Es decir, las células se incubaron en 0,5 mg/ml de solución de MTT durante 4 horas a una temperatura de 37 °C para una reacción, y luego, los productos formados a partir de ellos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, se midió su absorbancia a 540 nm usando un espectrómetro.

**5. Tratamiento farmacológico in vivo.**

30 Los ratones DK (5 meses de edad, N = 6) se administraron con portador, SLCB050 (5 o 10 mg/kg), Adriamicina (1, 2,5 o 5 mg/kg), y una combinación de SLCB050 y Adriamicina mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Después de la finalización del experimento de cada grupo, los ratones se diseccionaron y se aislaron tejidos pulmonares. Para el xenoinjerto, se sembraron  $1 \times 10^7$  células H446 (ATCC) en hielo limpio. Después de 4 semanas, los ratones que portan tumores fueron inyectados con Adriamicina, SLCB050, o una combinación de los mismos durante 6 semanas. Cada semana, se midieron el volumen tumoral y el peso corporal.

**6. Análisis histológico**

Después de la disección de los ratones, los tejidos se fijaron usando formalina al 10% (en PBS) durante 24 horas, y se embebieron en bloques de parafina de acuerdo con un procedimiento básico de procesamiento de tejidos. Para el análisis histológico, los tejidos embebidos se cortaron a 5  $\mu$ m mediante un microtomo Leica (Wetzlar, Alemania) y se transfirieron a portaobjetos recubiertos con adhesivo (cristalería de laboratorio Marienfeld, Alemania). Después de desparafinar y la rehidratación, las secciones se tiñeron entonces con H&E para un examen de rutina.

Para la tinción con IHC, las secciones de tejido rehidratado se incubaron con anticuerpos contra Ki-67 (Abcam, ab15580), pan-queratina (Sigma, C2931), pro-tensioactivo C (Millipore, AB3786), NSE (DAKO, IS612) y HER2/Neu (DAKO, A0458) para una reacción. La recuperación de antígeno se realizó usando citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) dos veces a una temperatura de 95 °C durante 10 minutos cada uno, y la actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con peroxidasa de hidrógeno al 3% durante 10 minutos. Luego, los portaobjetos se deshidrataron siguiendo un procedimiento estándar y se sellaron con una cubierta de vidrio usando una solución de montaje. La reacción

TUNEL se realizó como se describe en el manual del kit de Detección de Muerte Celular in situ, POD (Hoffmann-La Roche Ltd, Basilea, Suiza).

#### 7. Análisis de incidencia y área tumoral.

5 Para evaluar la incidencia de tumores, los tejidos pulmonares de cada ratón se fijaron y embebieron en parafina. 5 secciones de cada ratón fueron examinadas por 3 investigadores independientes, quienes contaron el tumor. Además, el área tumoral se calculó por el área ocupada por el tumor en el área pulmonar total utilizando el software Photoshop.

#### 8. Resultados del experimento

10 Como se muestra en las Figuras 4A y 4B, el tratamiento con SLCB050 bloqueó la interacción de DX2-p14/ARF, y DX2 y p14/ARF se localizaron en el núcleo. Además, se observó el aumento de p14/ARF en las líneas celulares H1299 y H69 tratadas con SLCB050 como se muestra en la Figura 4C mientras se observó la reducción de DX2 en líneas celulares deficientes en p14/ARF (H322, H460 y A549) como se muestra en la Figura 4D. Además, las líneas celulares deficientes en p14/ARF eran resistentes a SLCB050 como se muestra en la Figura 5, mientras que las líneas celulares SCLC fueron sensibles a SLCB050. En particular, SLCB050 suprimió completamente el crecimiento de células H128 como se muestra en la Figura 6. Además, HJH141204 y HJH141206 también suprimieron la viabilidad celular como se muestra en la Figura 7, y en consecuencia, se confirmó que la supresión del crecimiento de células tumorales se logró mediante la unión del compuesto DX2.

20 Se evaluó si SLCB050 pudo restablecer la sensibilidad al fármaco anticáncer. Como se muestra en la Figura 8A, la resistencia a GN 25 (sintetizada como se describe en KR 1298168) en DX2 y DK MEF fue abolida por el cotratamiento de SLCB050. Además, como se muestra en la Figura 8B, la resistencia a Adriamicina en DX2 y DK MEF fue abolida por el cotratamiento de Adriamicina (Adr) y SLCB050. Además, como se muestra en la Figura 8C, la línea celular SCLC H69 se respondió parcialmente a SLCB050. Sin embargo, como se muestra en la Figura 8C, H322 deficiente en p14/ARF no mostró respuesta sinérgica al tratamiento combinado con SLCB050.

25 Como se muestra en la Figura 9A, el modelo de xenoinjerto tumoral que usaba H446 era resistente a la adriamicina y respondía parcialmente a SLCB050. Además, como se muestra en la Figura 9B, el aumento del volumen tumoral en el modelo de xenoinjerto tumoral que usa H446 fue moderadamente suprimido por inyección de SLCB050 (10 mg/kg, tres veces/semana). Además, el efecto de inhibición del tumor se observó mediante la inyección de 5 mg/kg de adriamicina (tres veces/semana), pero provocó la pérdida rápida de peso y la muerte. En contraste, el tratamiento combinacional con SLCB050 (10 mg/kg) mostró un efecto anticáncer más obvio como se muestra en la Figura 9B, a pesar de la baja dosificación (2,5 mg/kg) de tratamiento con adriamicina. De hecho, el tratamiento combinacional de Adriamicina y SLCB050 obviamente podría inducir la expresión de p53 en células tumorales primarias obtenidas de ratones DX2 o DK como se muestra en la Figura 9C. Estos resultados indican que la inhibición de DX2 podría mejorar la sensibilidad al fármaco anticáncer mediante la reactivación de p14/ARF.

35 Para evaluar el efecto anticáncer de SLCB050 en un modelo de ratón, se inyectó SLCB050 en ratones DK de acuerdo con un programa experimental como se muestra en la Figura 10 A. El tratamiento combinacional de SLCB050 (10 mg/kg) y dosis bajas (2,5 mg/kg) de adriamicina suprimió significativamente la progresión tumoral como se muestra en las Figuras 10B y 10C sin pérdida de peso significativa. Sin embargo, como se muestra en la Figura 10B, la dosis no tóxica de Adriamicina no mostró efecto anticáncer en el modelo de ratón.

40 Un análisis histológico más detallado mostró que la región SCLC se borró más obviamente por el tratamiento combinacional de Adriamicina y SLCB050 como se muestra en la Figura 11. Como se muestra en la Figura 12A, bajo condiciones de reducción de DX2 tras el tratamiento con SLCB050, las células tumorales apoptóticas obviamente aumentaron como se muestra en las Figuras 12B y 12C. Estos resultados indican que el DX2 producido por el empalme aberrante de AIMP2 promueve la progresión tumoral, en particular, el cáncer de pulmón de células pequeñas, a través de la interacción directa y la inhibición de p14/ARF como se muestra en la Figura 13. Por lo tanto, se confirmó que el cáncer de pulmón de células pequeñas se trataría con el compuesto que inhibe la unión de DX2-p14/ARF.

### **<Ejemplo 3> Medición comparativa de los niveles de expresión de AIMP2-DX2 en células SCLC y NSCLC**

#### 1. Cultivo celular

50 Las líneas celulares de NSCLC (A549, H1299, NCI-H23, NCI-H322, NCI-H358 y NCI-H460), las líneas celulares HCT116 y las líneas celulares HEK293 estaban disponibles en American Type Culture Collection (Manassas, VA), y se cultivaron en medio RPMI-1640 o DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de antibióticos.

NCI-H69, NCI-H128 y NCI-H146, las cuales son líneas celulares SCLC, se adquirieron de Korean Cell Line Bank (Seúl, Corea) y se cultivaron en un medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS.

2. Medición de los niveles de expresión de AIMP2-DX2

Las células cultivadas en tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris-Cl 25 mM, NonidetP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, dodecil sulfato de sodio al 0,1%, cóctel inhibidor de la proteasa) se suspendieron para separar las proteínas de las mismas.

5 Una muestra que incluía las proteínas separadas se inactivó térmicamente a una temperatura de 95 °C durante 7 minutos, y luego, las proteínas resultantes se aplicaron a SDS-PAGE, seguido de análisis de transferencia Western de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica (T. Mahmood , PC Yang. N. Am. J. Med. Science. 4: 429-434, 2012).

Se usaron anticuerpos de actina disponibles comercialmente (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology), y se prepararon anticuerpos AIMP2 y AIMP2-DX2 de acuerdo con un procedimiento de preparación de anticuerpos convencional.

10 Como se muestra en la Figura 14, AIMP2-DX2 se expresó de manera similar en células NSCLC y células SCLC sin una diferencia significativa.

3. Medición de la transcripción de AIMP2-DX2

15 Para medir los niveles de transcripción de ATMP2-DX2, se utilizaron células NSCLC, tal como A549, H1299, H23, H322 y H460, y células SCLC, tal como H146 y H69. Las secuencias de cebador de SEQ ID NO: 1 o 2 listadas en la Tabla 1 se usaron para amplificar ATMP2-DX2, y las secuencias de cebador de SEQ ID NO: 3 o 4 listadas en la Tabla 1 se usaron para amplificar GAPDH.

En consecuencia, como se muestra en la Figura 15, los niveles de transcripción de AIMP2-DX2 no fueron diferentes de los de las células SCLS y las células NSCLC.

[Tabla 1]

Nombre del cebador		Secuencia	SEQ ID NO
Avance	ATMP2-DX2	5'-AACGTGCACGGCAGGAGCTAC -3'	1
Reversa	ATMP2-DX2	5'-CCAGCTGATAGTCTTGGCGGG -3'	2
Avance	GAPDH	5'-ATCTTCCAGGAGCGAGATCCC -3'	3
Reversa	GAPDH	5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGCTC -3'	4

20

**<Ejemplo 4> Medición de los niveles séricos de autoanticuerpos AIMP2-DX2 de pacientes con SCLC y NSCLS**

25 Se obtuvieron sueros de individuos sanos y pacientes con SCLC y NSCLC del Bucheon Hospital (schbc-biobank-2011-003). Para medir los niveles de anticuerpos anti-AIMP2-DX2, los niveles de autoanticuerpos se midieron de acuerdo con el protocolo de experimento que se muestra en la Figura 16. AIMP2-DX2 recombinante, Lamin A y Snail se unieron cada uno sobre una membrana de nitrocelulosa (0,5 ng/pocillo). Aquí, cada membrana se incubó con una muestra en suero, la cual se diluyó con tampón de bloqueo en una relación de 1:1000, para una reacción durante 1 hora, y secuencialmente con anticuerpos anti-humanos conjugados a (HRP) (1:20.000) durante 30 minutos. Luego, los sitios en los que se unieron los anticuerpos humanos se visualizaron mediante ECL en términos de quimioluminiscencia y exposición a película de rayos X.

30

Como resultado, como se muestra en la Figura 17, los autoanticuerpos AIMP2-DX2 no se detectaron en absoluto en el grupo control (individuos sanos) mientras se detectaron en un grupo de pacientes con NSCLC o SCLC. En particular, en el caso de un grupo de pacientes con SCLC (8 de 10 casos) se detectaron autoanticuerpos AIMP2-DX2 y, por lo tanto, se confirmó que los autoanticuerpos AIMP2-DX2 se detectaron significativamente en el suero de un grupo de pacientes con SCLC.

35

Sin embargo, SLCB050 puede formularse en diversas formas de acuerdo con los propósitos. A continuación, se proporcionan realizaciones de formulaciones que usan el compuesto de la presente invención como un componente efectivo, pero la presente invención no se limita a las mismas.

**<Ejemplo de formulación 1> Comprimido (presurización directa)**

40 Se filtraron 5,0 mg de SLCB050 a través de un tamiz y luego se mezclaron con 14,1 mg de lactosa, 0,8 mg de Crospovidona USNF y 0,1 mg de estearato de magnesio. Se aplicó presión a la misma para preparar la mezcla en forma de un comprimido.

**<Ejemplo de formulación 2> Comprimido (granulación en húmedo)**

5 Se filtraron 5,0 mg de SLCB050 a través de un tamiz y luego se mezclaron con 16,0 mg de lactosa y 4,0 mg de almidón. Una solución en la que se disolvieron 0,3 mg de Polisorbato 80 en agua pura se añadió a la mezcla en una cantidad apropiada, y luego, la solución resultante se sometió a refinación de grano. Después de secar, los granos se filtraron a través de un tamiz y luego se mezclaron con 2,7 mg de dióxido de silicio coloidal y 2,0 mg de estearato de magnesio. Se aplicó presión a los mismos para preparar los granos en forma de un comprimido.

**<Ejemplo de formulación 3> Polvo y cápsula**

10 Se filtraron 5,0 mg de SLCB050 a través de un tamiz y luego se mezclaron con 14,8 mg de lactosa, 10,0 mg de polivinilpirrolidona y 0,2 mg de estearato de magnesio. La mezcla se añadió a la cápsula de gelatina dura de tamaño 5 usando un dispositivo apropiado, preparando así la mezcla en forma de cápsula.

**<Ejemplo de formulación 4> Inyección**

15 Se mezclaron 100 mg de SLCB050, 180 mg de manitol, 26 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O y 2,974 mg de agua destilada. Se llenó una ampolla de vidrio transparente con la solución mixta y luego se selló bajo un reticulado superior disolviendo el vidrio. Se realizó un proceso de esterilización a través de autoclave a una temperatura de 120 °C durante al menos 15 minutos, preparando así la mezcla en forma de inyección.

Debe entenderse que las realizaciones descritas en el presente documento deben considerarse solo en un sentido descriptivo y no con fines de limitación. Las descripciones de características o aspectos dentro de cada realización deben considerarse típicamente como disponibles para otras características o aspectos similares en otras realizaciones.

20 [Texto libre de la lista de secuencias]

SEQ ID NO: 1 o 2 es una secuencia base de un par de cebadores para amplificar AIMP2-DX2.

SEQ ID NO: 3 o 4 es una secuencia base de un par de cebadores para amplificar GAPDH.

SEQ ID NO: 5 es una secuencia de aminoácidos de una proteína AIMP2-DX2.

SEQ ID NO: 6 es una secuencia de aminoácidos de una proteína AIMP2-DX2.

25 <110> Pusan National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Nuevo compuesto para inhibir la unión entre DX2 y p14/ARF, y composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer que comprende el mismo

<130> AOP-2015-0042/PCT

<160> 6

30 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> cebador de avance AIMP2-DX2

<400> 1

aacgtgcacg gcaggagcta c 21

<210> 2

40 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador de retroceso AIMP2-DX2  
 <400> 2  
 ccagctgata gtcttgccg g      21  
 5      <210> 3  
       <211> 21  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 10      <223> cebador de avance GAPDH  
       <400> 3  
       atctccagg agcgagatcc c      21  
       <210> 4  
       <211> 21  
 15      <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
       <223> cebador de retroceso GAPDH  
       <400> 4  
 20      agtgagcttc ccgtcagct c      21  
       <210> 5  
       <211> 251  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia Artificial  
 25      <220>  
       <223> AIMP2-DX2 de Homo sapiens  
       <400> 5

ES 2 753 650 T3

Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly  
 20 25 30  
 Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly  
 35 40 45  
 Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu  
 50 55 60  
 Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu  
 85 90 95  
 Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr  
 100 105 110  
 Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met  
 115 120 125  
 Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile  
 130 135 140  
 Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn  
 145 150 155 160  
 Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys  
 165 170 175  
 Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser  
 180 185 190  
 Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala  
 195 200 205  
 Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val  
 210 215 220  
 Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys  
 245 250

<210> 6

<211> 243

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AIMP2-DX2 de Homo sapiens

<400> 6

ES 2 753 650 T3

Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu  
1 5 10 15

Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly  
20 25 30

Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly  
35 40 45

Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu  
50 55 60

Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu  
65 70 75 80

Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu  
85 90 95

Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr  
100 105 110

Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met  
115 120 125

Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile  
130 135 140

Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn  
145 150 155 160

Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys  
165 170 175

Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser  
180 185 190

Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala  
195 200 205

Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val  
210 215 220

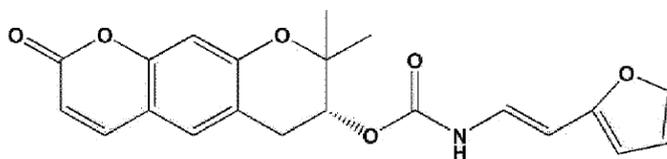
Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu  
225 230 235 240

Ala Pro Phe

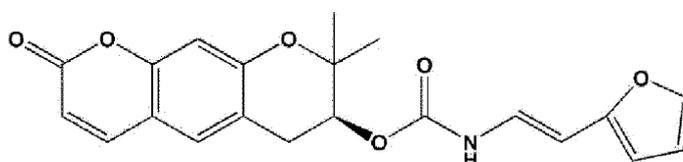
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la Fórmula 1 o 2:

[Fórmula 1]

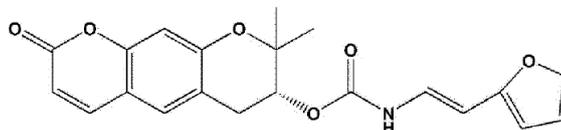


[Fórmula 2]

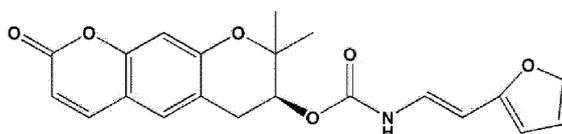


- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto inhibe la unión entre las proteínas DX2 y p14/ARF.
3. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa, comprendiendo la composición farmacéutica, como ingrediente activo, un compuesto representado por las Fórmulas 1 a 3:

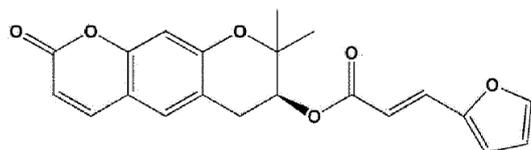
[Fórmula 1]



[Fórmula 2]



[Fórmula 3]



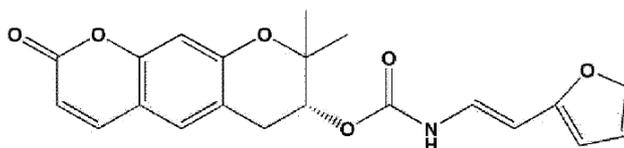
- 10 4. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 3, en la que el compuesto inhibe la unión entre DX2 y p14/ARF.
5. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 3, en la que la enfermedad cancerosa se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer cervical uterino, cáncer de endometrio, coriocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, melanoma maligno, linfoma y neoplasia maligna hematológica.
- 15

6. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 5, en la que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas.

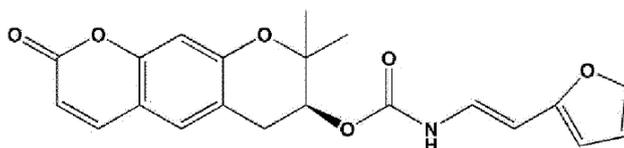
7. Una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la resistencia a fármacos de un fármaco anticáncer, comprendiendo la composición farmacéutica, como ingrediente activo, un compuesto representado por las Fórmulas 1 a 3:

5

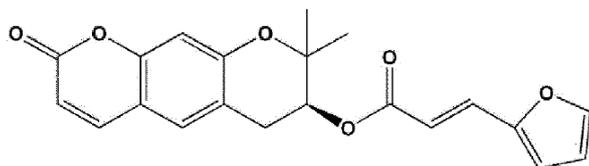
[Fórmula 1]



[Fórmula 2]



[Fórmula 3]



10

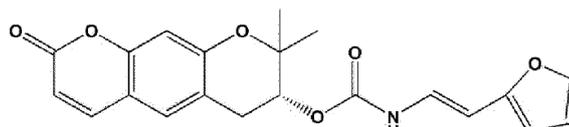
8. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 7, en la que el fármaco anticáncer se selecciona del grupo que consiste en Adriamicina, Capecitabina, Caboplatino, Cisplatino, Oxaliplana, Ciclofosfamida, Docetaxel, Paclitaxel, Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Valrubicina, Mitoxantrona, Curcumina, Gefitinib, Erlotinib, Irinotecán, Topotecán, Vinblastina, Vincristina, Gemcitabina, Metotrexato, Trastuzumab, Vinorelbina, Fluorouracilo y ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxonaftalen-2-iltio) propanoico.

9. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 7, en la que el compuesto inhibe la unión entre las proteínas DX2 y p14/ARF, de tal manera que se inhibe la resistencia a fármacos del agente anticáncer y se potencia el efecto anticáncer del agente anticáncer.

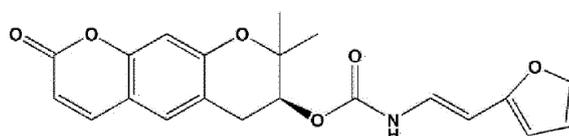
15

10. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 en el tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa, comprendiendo la composición farmacéutica, como componentes efectivos, un compuesto representado por las Fórmulas 1 a 3 y un fármaco anticáncer:

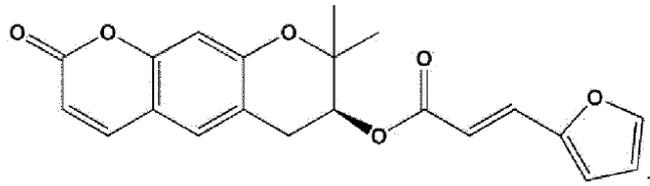
[Fórmula 1]



[Fórmula 2]

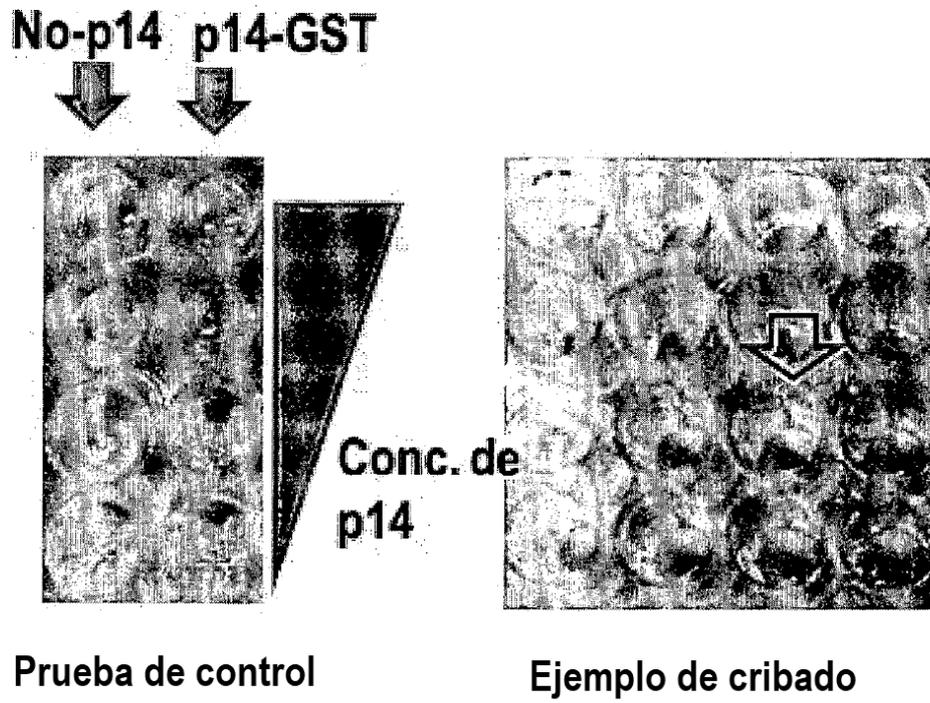


[Fórmula 3]

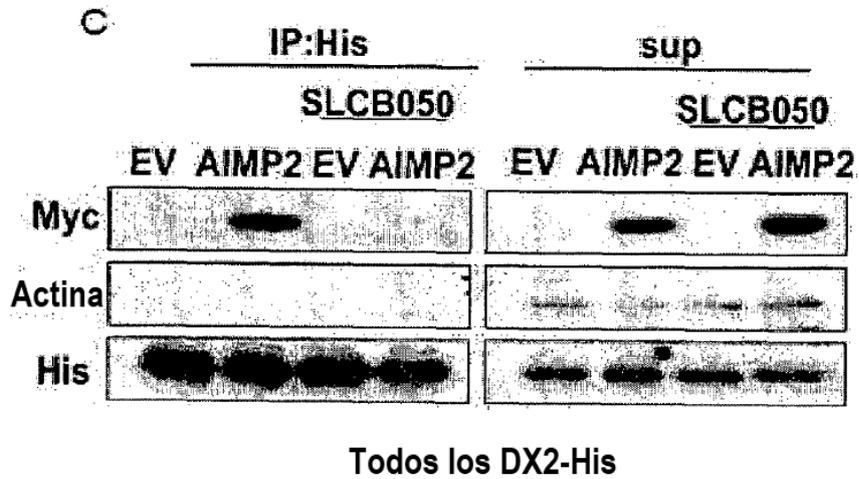
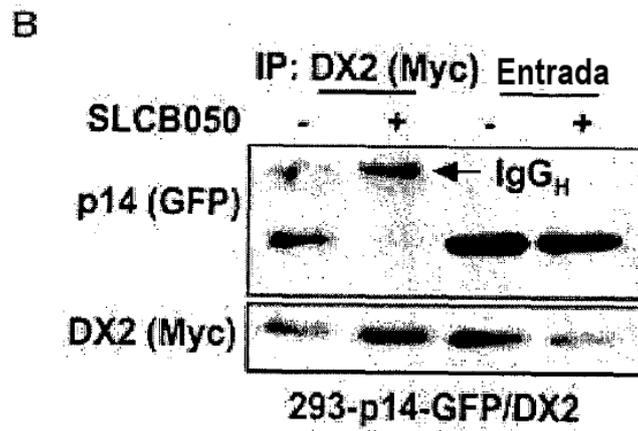
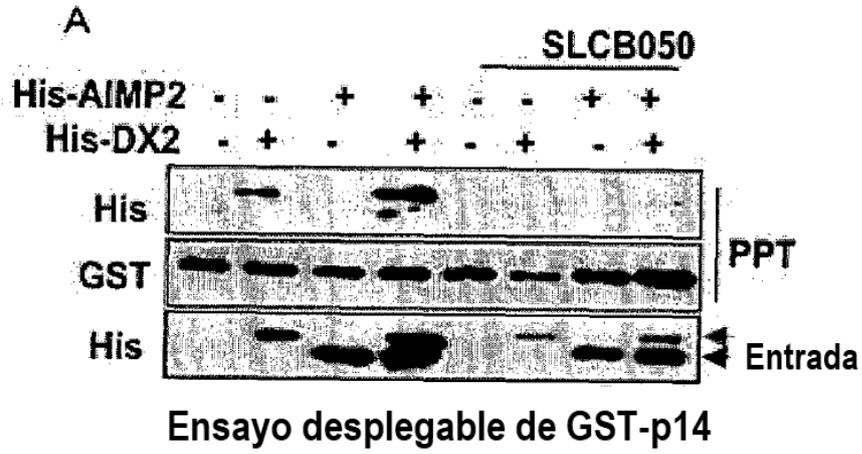


- 5 11. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 10, en la que el fármaco anticáncer se selecciona del grupo que consiste en Adriamicina, Capecitabina, Caboplatino, Cisplatino, Oxaliplana, Ciclofosfamida, Docetaxel, Paclitaxel, Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Valrubicina, Mitoxantrona, Curcumina, Gefitinib, Erlotinib, Irinotecán, Topotecán, Vinblastina, Vincristina, Gemcitabina, Metotrexato, Trastuzumab, Vinorelbina, Fluorouracilo y ácido 3-(5,8-dimetoxi-1,4-dioxonaftalen-2-iltio)propanoico.
- 10 12. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 10, en la que la enfermedad cancerosa se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer cervical uterino, cáncer de endometrio, coriocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, melanoma maligno, linfoma y neoplasias malignas hematológicas.
- 15 13. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 12, en la que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas.

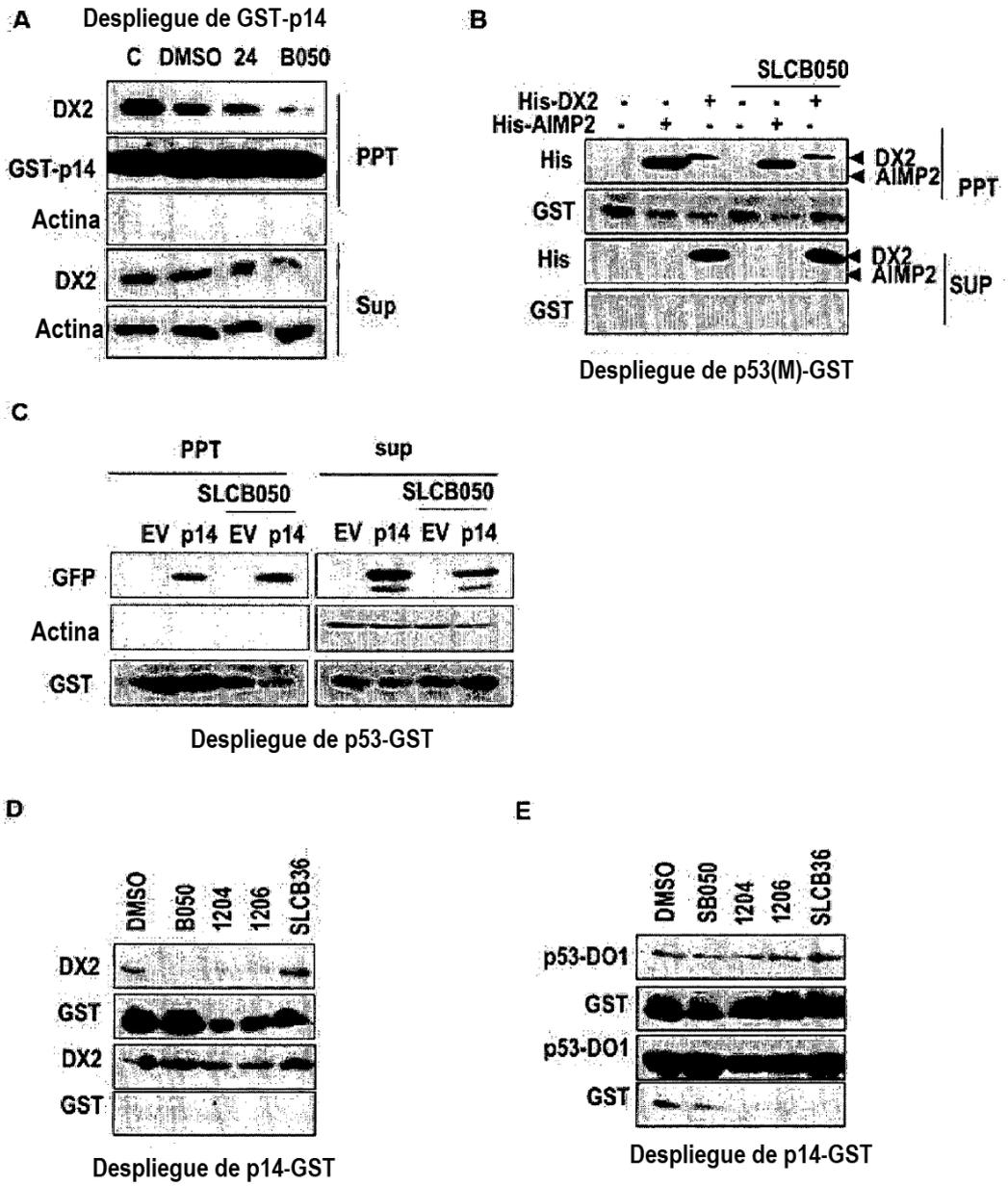
[FIG. 1]



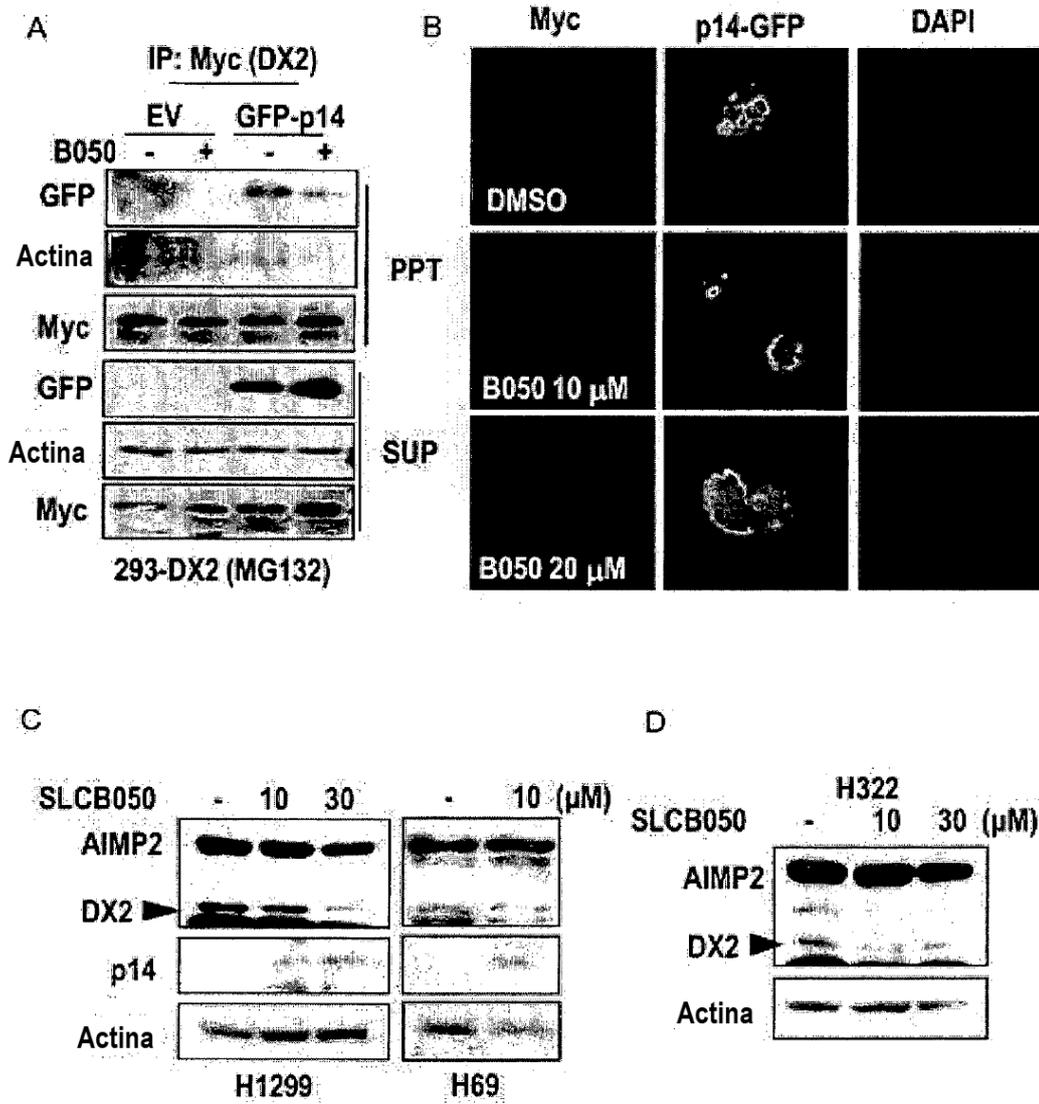
[FIG. 2]



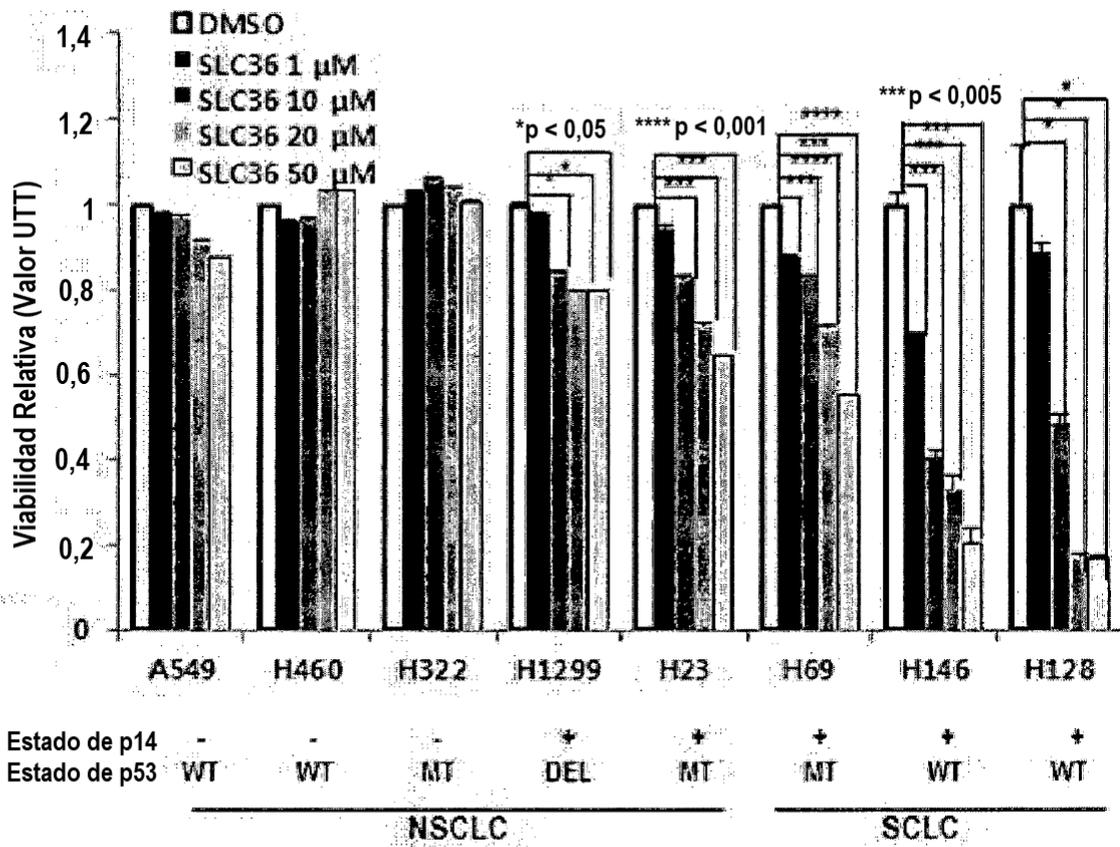
[FIG. 3]



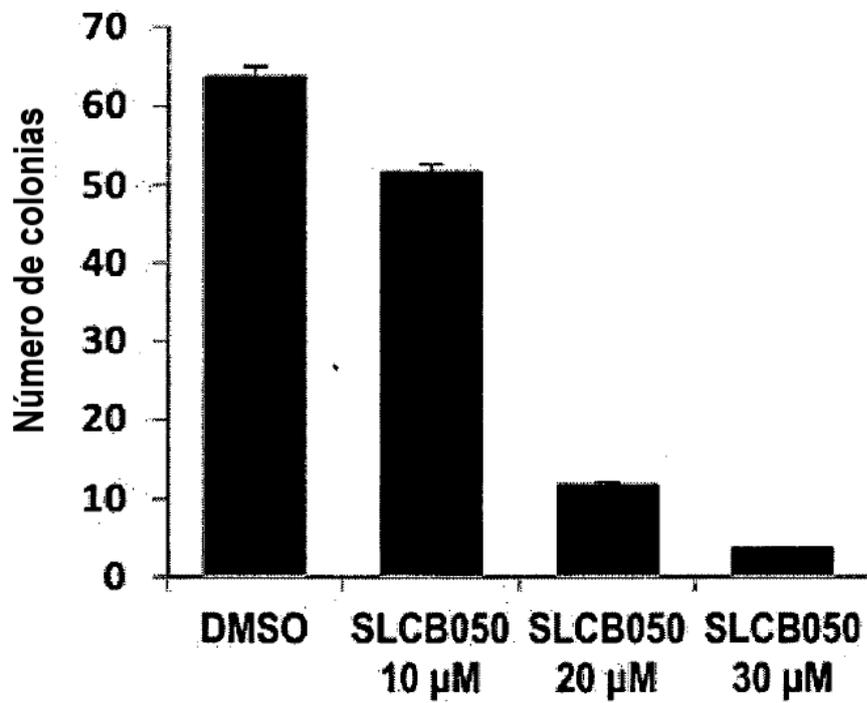
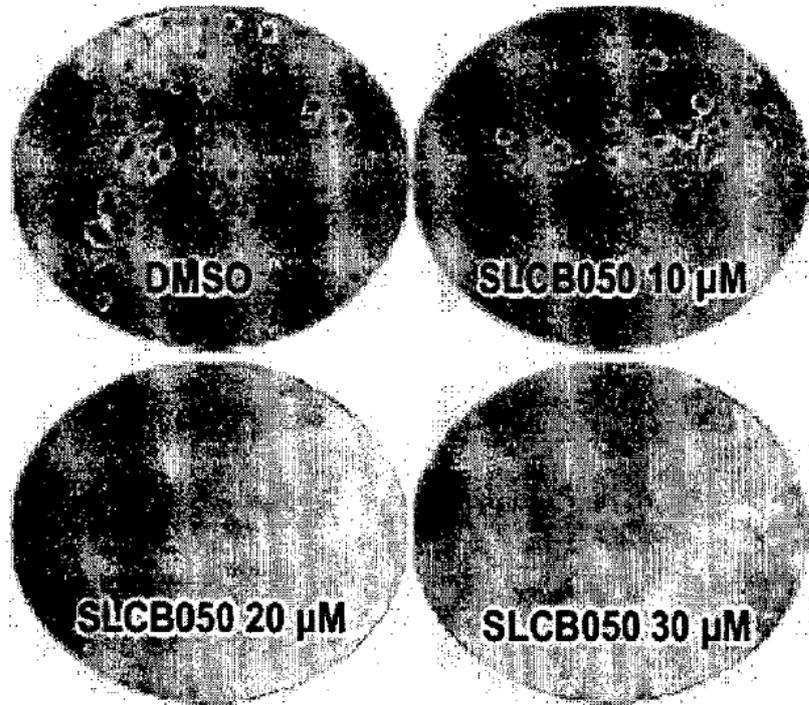
[FIG. 4]



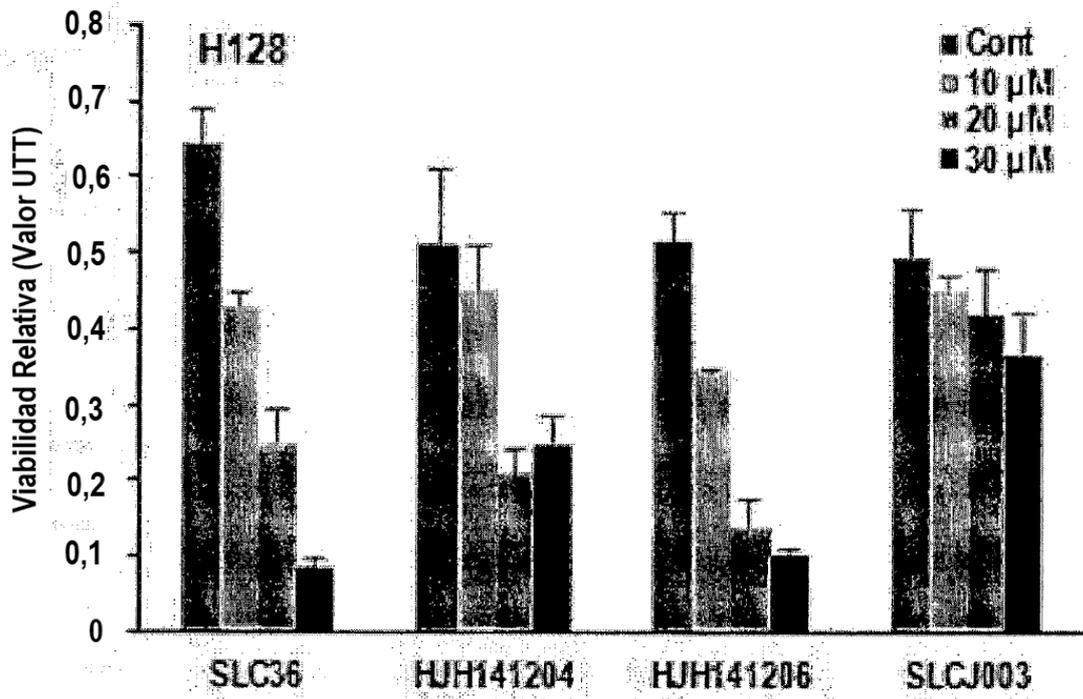
[FIG. 5]



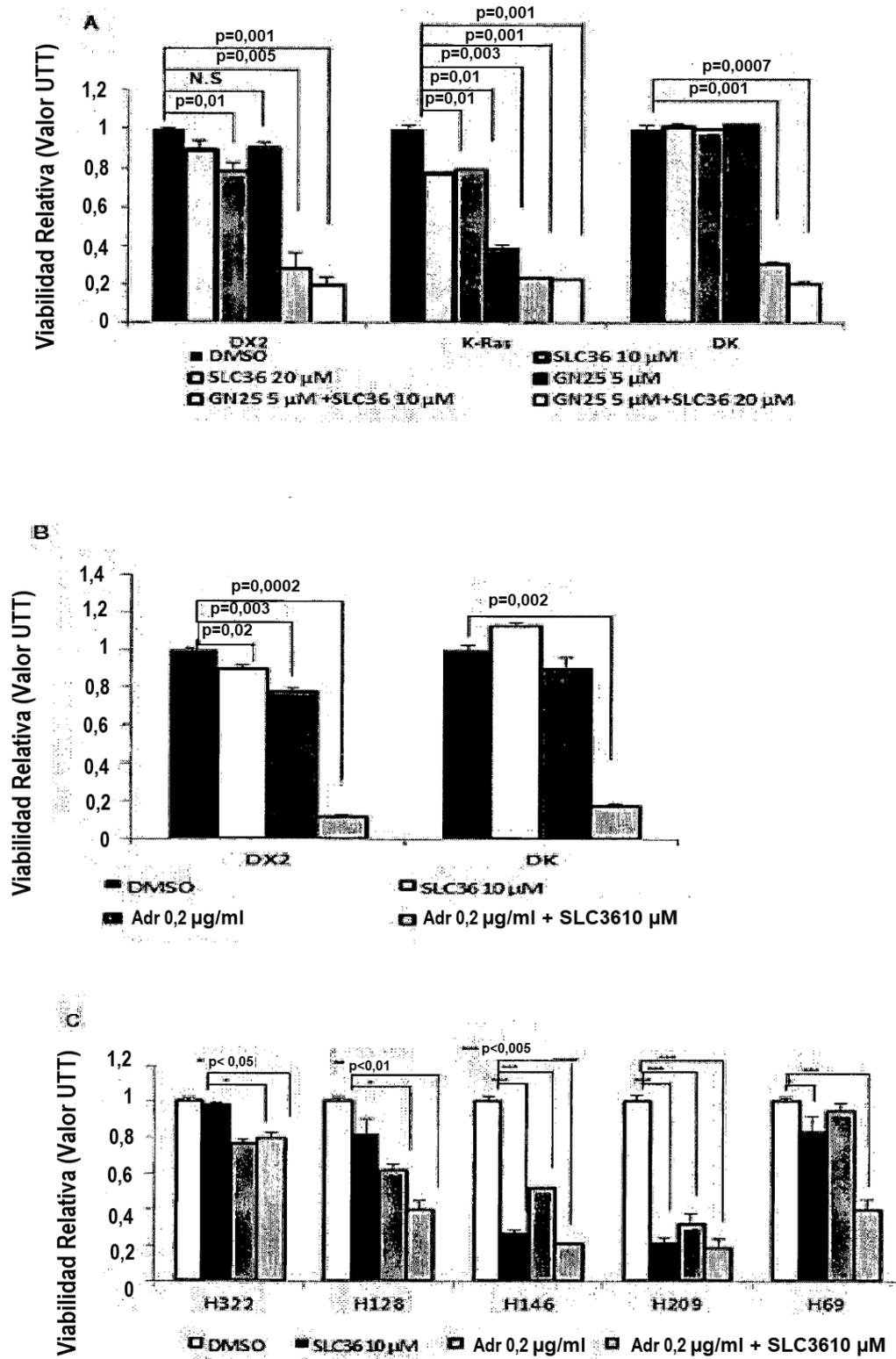
[FIG. 6]



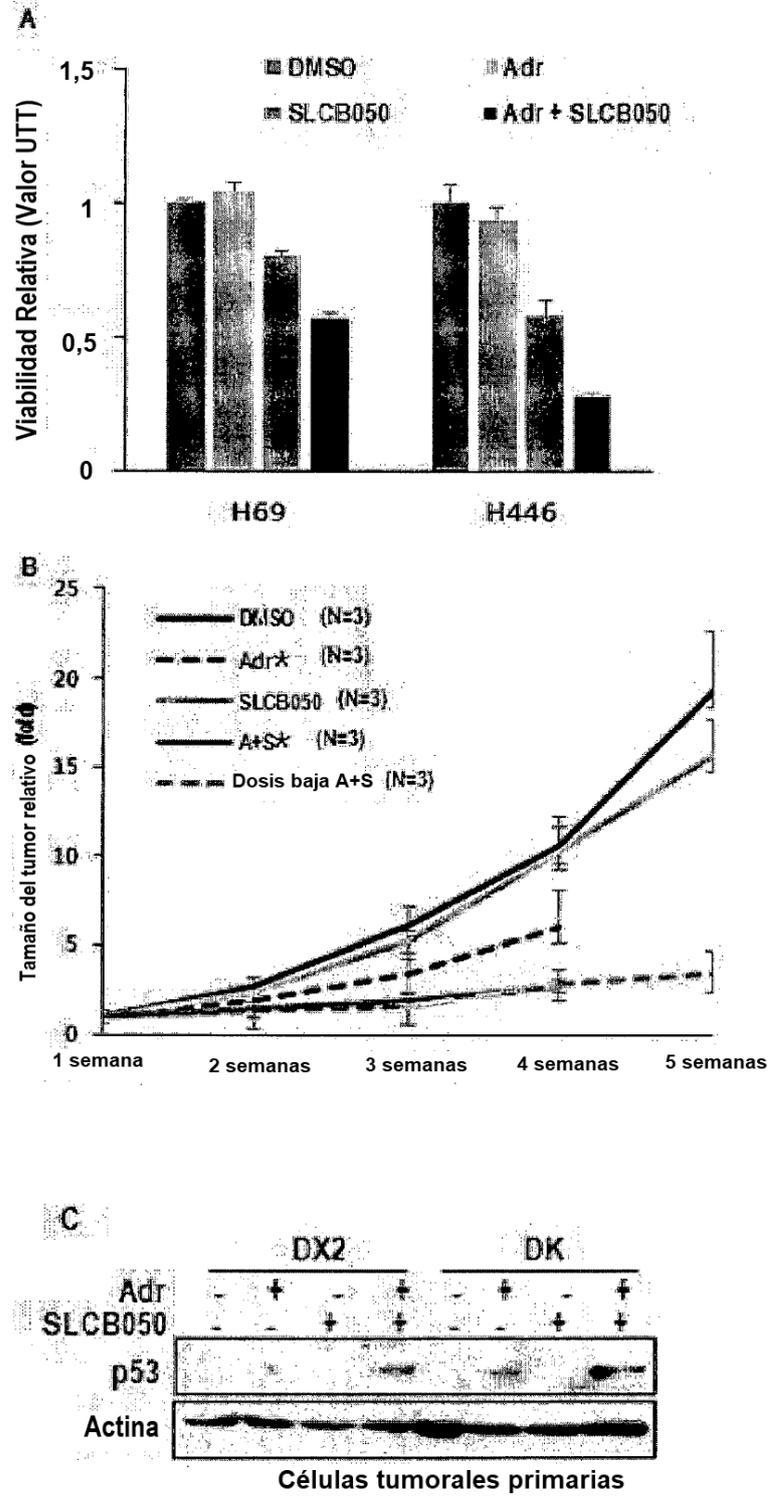
[FIG. 7]



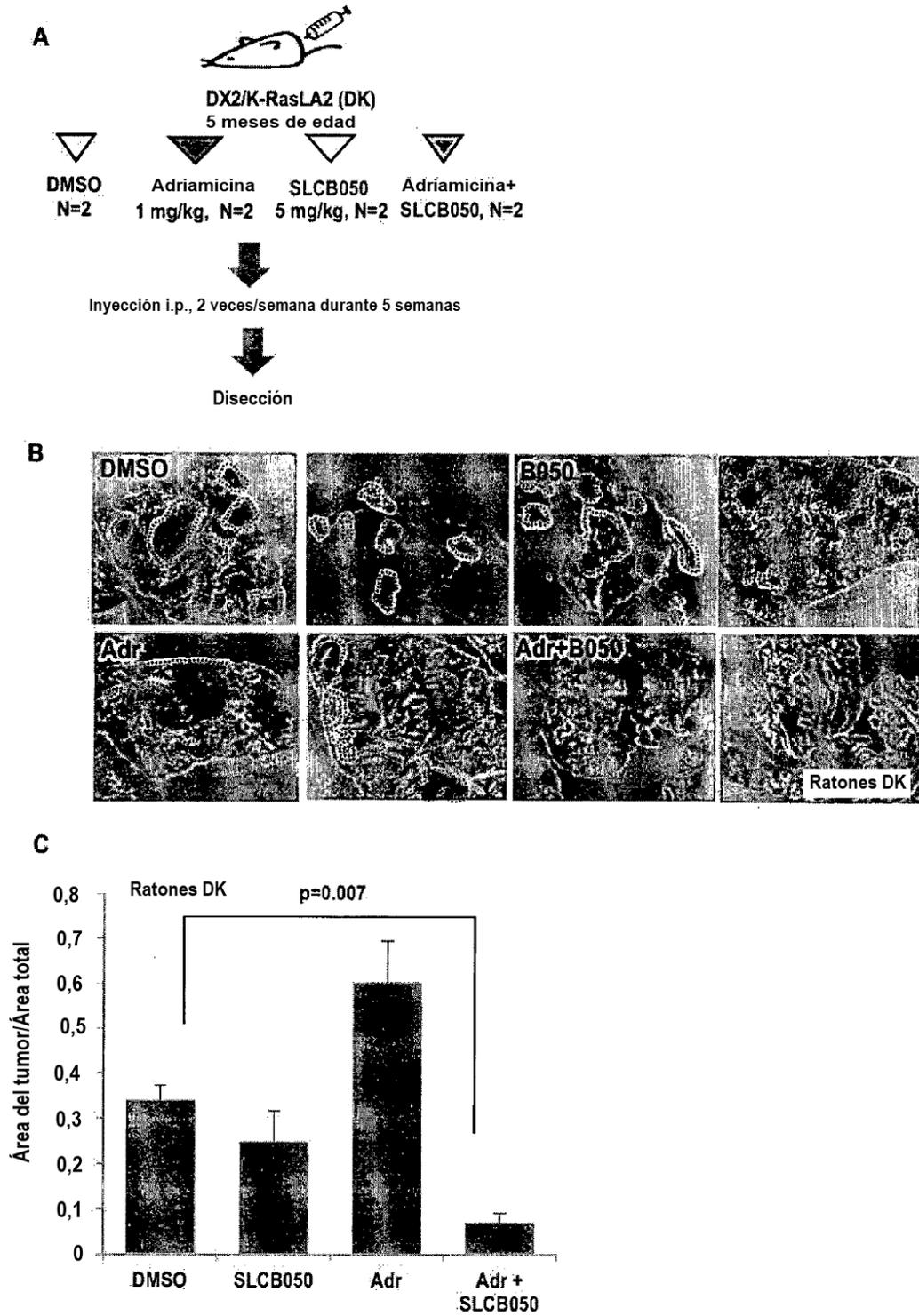
[FIG. 8]



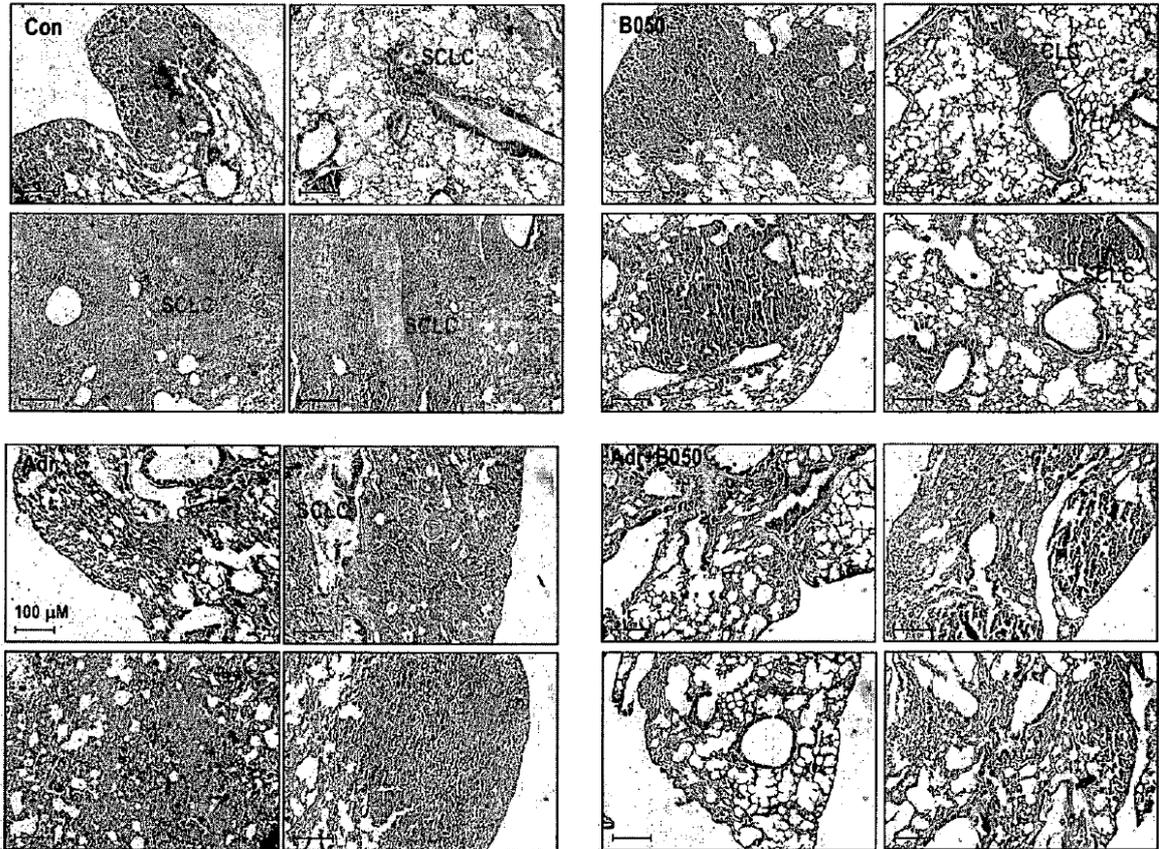
[FIG. 9]



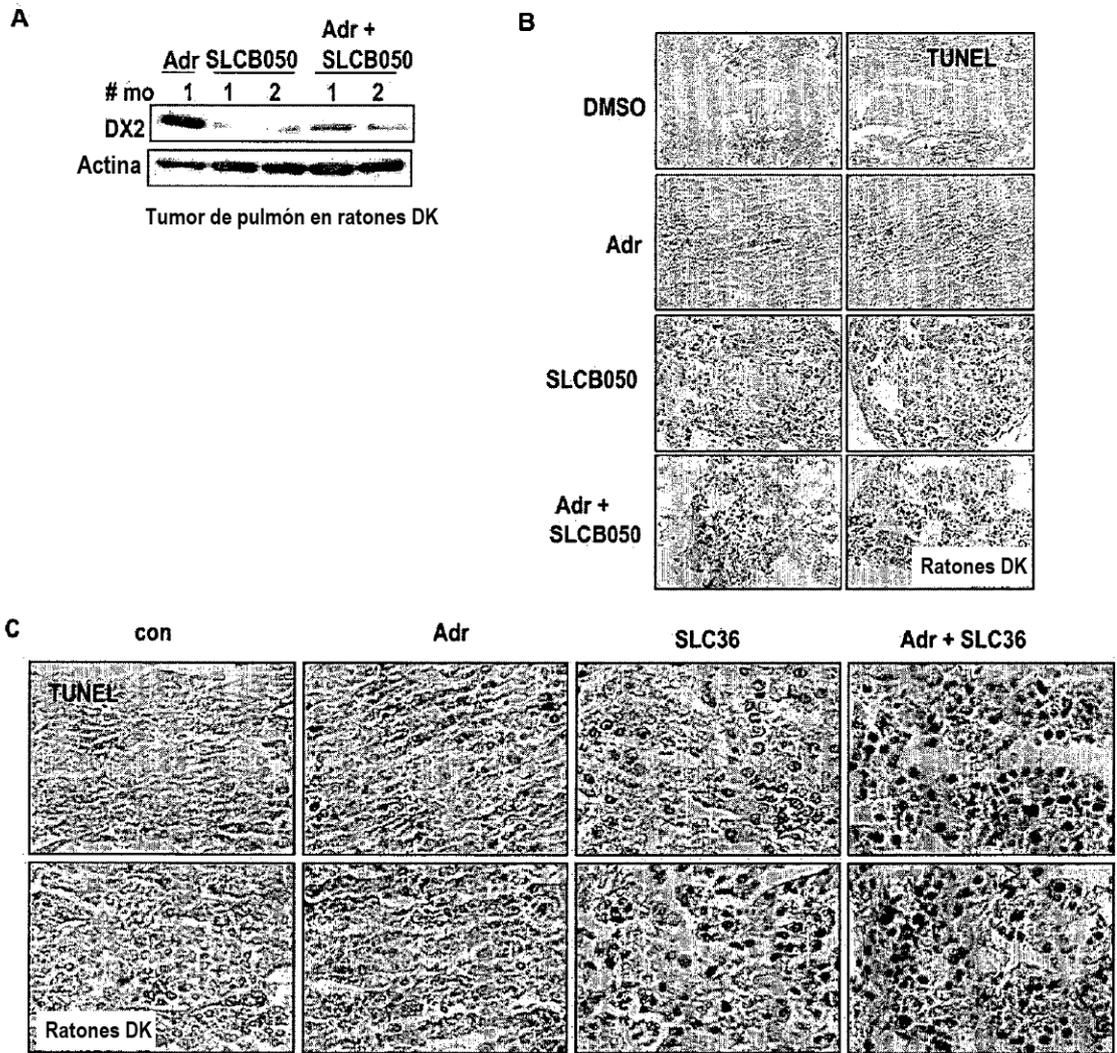
[FIG. 10]



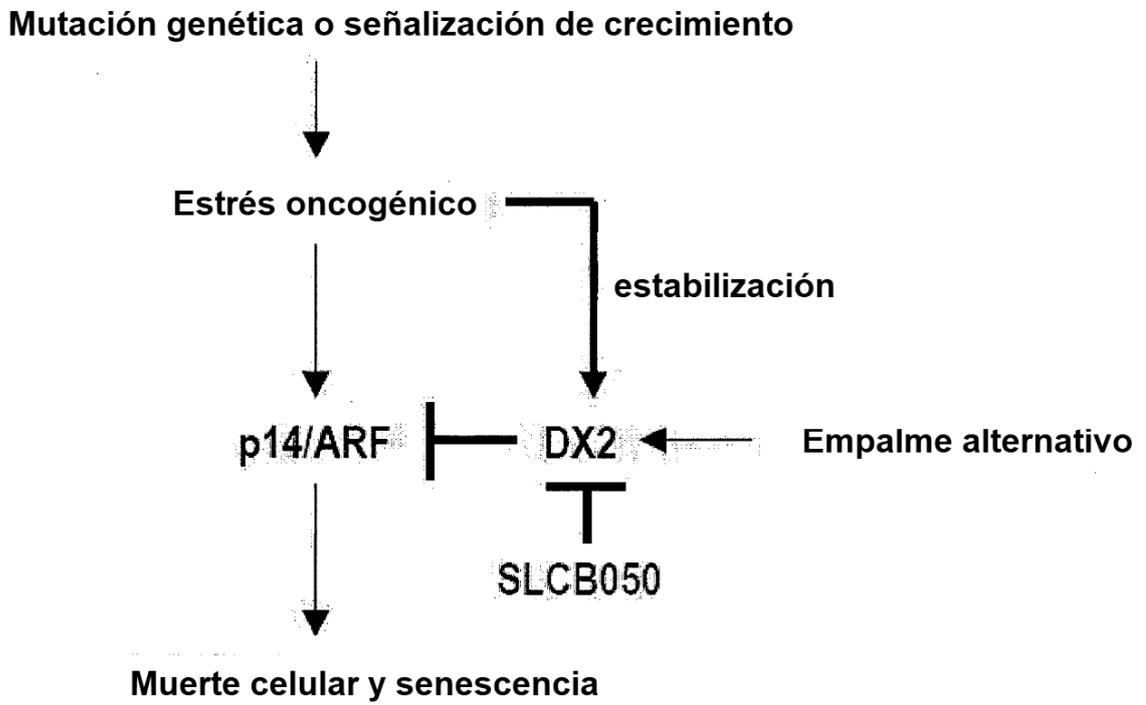
[FIG. 11]



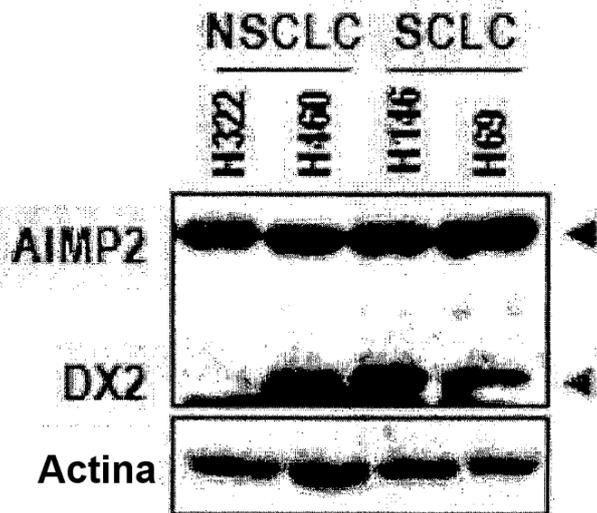
[FIG. 12]



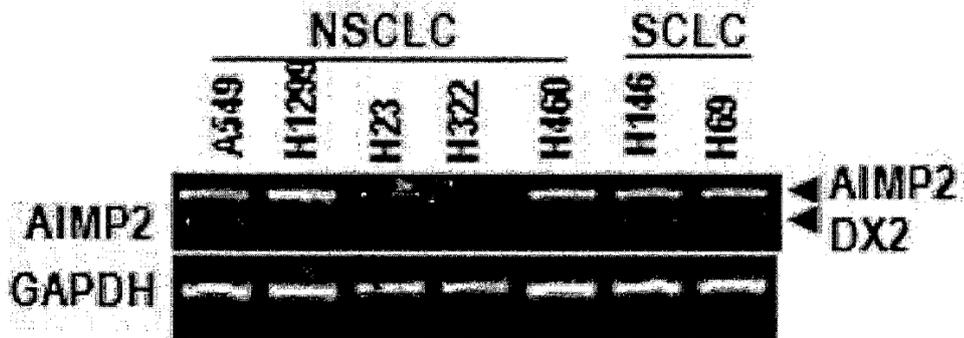
[FIG. 13]



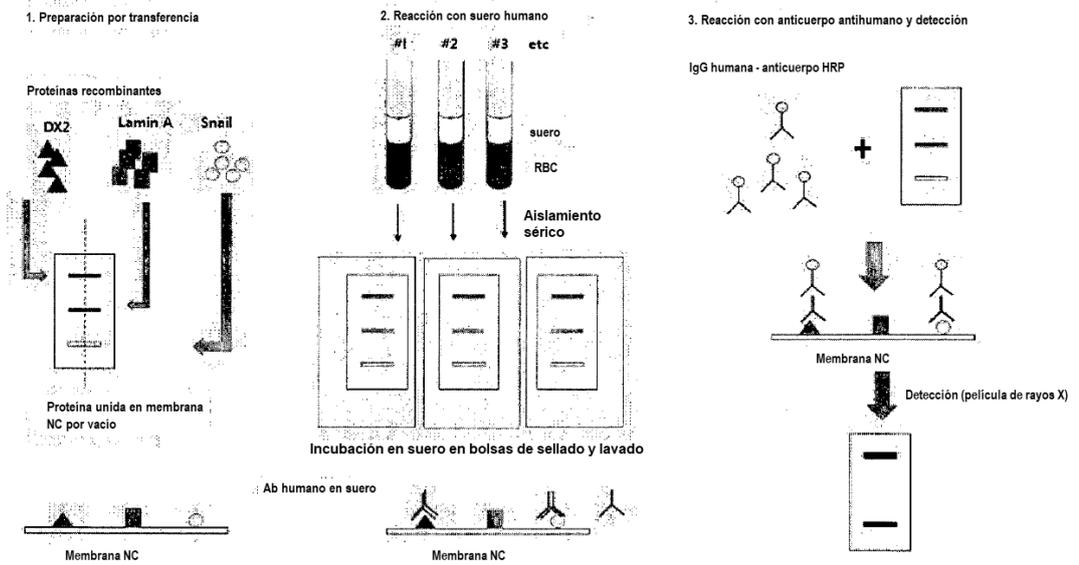
[FIG. 14]



[FIG. 15]



[FIG. 16]



[FIG. 17]

