

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 046**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2013 PCT/US2013/039362**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13166344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2013 E 13721886 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2844764**

54 Título: **Biomarcadores para la terapia inhibidora de IAP**

30 Prioridad:

04.05.2012 US 201261642899 P

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

05.12.2016

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CAMERON, JOHN SCOTT;
EMERY, CAROLINE;
PORTER, DALE;
ROBINSON, DOUGLAS;
VENKATESAN, KAVITHA y
WANG, LI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 593 046 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

Biomarcadores para la terapia inhibidora de IAP

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con un método para el tratamiento del cáncer.

5 Antecedentes de la invención

La apoptosis (muerte celular programada) se activa por diversos estímulos, incluyendo muchos que son característicos de las células malignas, incluyendo desregulación del ciclo celular, transducción de señales aberrantes y estrés asociado con un microambiente desfavorable. Las células cancerosas también demuestran defectos en las sendas de apoptosis que les permiten evadir la muerte celular programada y que crean resistencia inherente a muchos agentes quimioterapéuticos. Los inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAPs) son una familia de ocho proteínas definidas por la presencia de un dominio de proteína, el dominio BIR, identificado inicialmente en una proteína baculoviral que inhibe la apoptosis. Algunos miembros de la familia IAP están claramente implicados en la supresión de la apoptosis. La evidencia es más fuerte para XIAP, CIAP1 y CIAP2 (Hunter Apoptosis; 12: 1543-1568, 2007), aunque los mecanismos mediante los cuales estas proteínas influyen en la apoptosis son diferentes. Hay fuertes indicios de que XIAP se enlaza directamente a las caspasas 3, 7 y 9, y que este enlace suprime la apoptosis (Deveraux, Nature; 388: 300-4, 1997). Por el contrario, la evidencia de las proteínas CIAP como supresores directos de la actividad de la caspasa es más débil. Sin embargo, las proteínas CIAP1 y CIAP2 son componentes de los complejos de señalización del receptor de muerte en donde influyen la supervivencia o muerte celular mediante la senda del factor nuclear Kappa B (NF-κB). La activación de la señalización del receptor de muerte puede inducir la señalización de supervivencia mediada por el NF-κB o la apoptosis, dependiendo del contexto celular. En algunas células tumorales, los antagonistas de IAP inducen apoptosis a través de un mecanismo que requiere TNF-α y RIPK1 (Gaither Cancer Research; 67: 11493-98, 2007). Por lo tanto, los IAPs parecen ser objetivos atractivos en el cáncer.

25 Resumen de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de que los biomarcadores particulares pueden ser utilizados para seleccionar los individuos que tienen cáncer que son propensos a responder al tratamiento con un inhibidor de IAP. Específicamente, se encontró el nivel de expresión de por lo menos tres biomarcadores seleccionados del siguiente grupo: CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1, por ejemplo, la expresión de ARNm de los biomarcadores, se pueden usar para predecir si ese individuo responderá al tratamiento con un inhibidor de IAP.

En un aspecto, la invención incluye un método para analizar una muestra biológica de un sujeto con cáncer, incluyendo la determinación de un nivel de expresión de ARNm de TNF y RIPK1 y uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) de los siguientes biomarcadores CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39 y MAPK14 en la muestra biológica tomada del sujeto, en donde el nivel de expresión de los biomarcadores en comparación con un control proporcionan un indicador de si el sujeto tiene una mayor probabilidad de respuesta a un inhibidor de IAP tal como la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

En otro aspecto, la invención incluye un método de selección de un sujeto que tiene cáncer para el tratamiento con un inhibidor de IAP como la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida. El método incluye la determinación de un nivel de expresión de ARNm de TNF, RIPK1 y STK39 en la muestra biológica tomada del sujeto, para predecir así una mayor probabilidad de respuesta a un inhibidor de IAP tal como la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

45 En aún otro aspecto, la invención incluye un método para tratar selectivamente un sujeto que tiene cáncer, el cual incluye:

- a) ensayar una muestra biológica del sujeto para determinar un nivel de expresión de TNF y RIPK1 y uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) de los siguientes biomarcadores CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39 y MAPK14 en la muestra biológica tomada del sujeto; y
- 50 b) administrar selectivamente un inhibidor de IAP tal como la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida al sujeto sobre la base de que la muestra tiene un nivel de expresión indicativo de que el sujeto tiene una mayor probabilidad de respuesta a un

inhibidor de IAP tal como la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilaminopropionamida.

5 En todavía otro aspecto, la invención incluye un método para tratar selectivamente un sujeto que tiene cáncer con un inhibidor de IAP como la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, el cual incluye la administración de un inhibidor de IAP tal como el inhibidor (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida al sujeto como resultado de que el sujeto tenga un mayor nivel de expresión de TNF y RIPK1 y una disminución del nivel de expresión de STK39.

El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer incluyendo cáncer de mama, de ovario y de pulmón.

10 El nivel de expresión de ARNm se puede determinar en los métodos de la invención usando RT-PCR.

En otro aspecto, la invención incluye un kit que incluye una pluralidad de agentes para la determinación del nivel de expresión de ARNm de TNF y RIPK1 y uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) de los siguientes biomarcadores CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39 y MAPK14 en una muestra biológica e instrucciones para su uso.

15 Un "biomarcador" es una molécula útil como indicador de un estado biológico en un sujeto. Con referencia a la presente materia, los biomarcadores divulgados en este documento pueden ser moléculas que exhiben un cambio en la expresión para predecir si un sujeto se beneficiaría de recibir el tratamiento con un inhibidor de IAP.

Descripción de las figuras

20 La figura 1 muestra una gráfica la cual ilustra que la expresión promedio del ARNm de STK39 medida mediante una PCR-TR cuantitativa es inferior en tumores humanos primarios que crecen como xenoinjertos en ratones que son sensibles (gris) a la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida en comparación con los tumores (blanco) refractarios.

25 La Figura 2 muestra una gráfica la cual ilustra que la expresión promedio del ARNm de TNF medida mediante PCR-TR cuantitativa es más alta en tumores humanos primarios que crecen como xenoinjertos en ratones que son sensibles a la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida en comparación con los tumores refractarios.

30 La Figura 3 muestra una gráfica la cual ilustra que la expresión promedio del ARNm de RIPK1 medida mediante PCR-TR cuantitativa es más alta en los tumores humanos primarios que crecen como xenoinjertos en ratones que son sensibles a la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida en comparación con los tumores refractarios.

Descripción detallada de la invención

35 Para maximizar el beneficio clínico potencial de un paciente que recibe un inhibidor de IAP es importante ser capaz de seleccionar aquellos pacientes que tienen tumores que son más propensos a responder a un inhibidor de IAP. Los métodos descritos en este documento se basan en la identificación de una pluralidad de biomarcadores que pueden ser utilizados para determinar la probabilidad que tiene un paciente de beneficiarse del tratamiento con inhibidores de IAP. Los biomarcadores de la invención se optimizan a propósito para la prueba clínica de rutina.

Biomarcador

40 El biomarcador de la invención incluye tres o más de los siguientes genes: CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1. Mediante el análisis del nivel de expresión de tres o más biomarcadores identificados anteriormente, es posible seleccionar aquellos individuos que tengan cánceres en donde los inhibidores de IAP sean probablemente más efectivos terapéuticamente.

45 Los biomarcadores de la invención incluyen la determinación de los niveles de ARNm de CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, MAPK14, TNF y RIPK1 (mayor expresión de ARNm relativa); y STK39 (menor expresión de ARNm relativa). En un ejemplo, el perfil de expresión puede ser un conjunto de valores que representan los niveles de ARNm, o proporciones de los niveles de expresión, de tres o más de los siguientes genes: CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1. En otro ejemplo, el perfil de expresión puede ser un conjunto de valores que representan los niveles de ARNm de STK39, TNF y RIPK1, o las proporciones de los niveles de expresión de ARNm para estos tres genes. Alta o baja expresión del ARNm

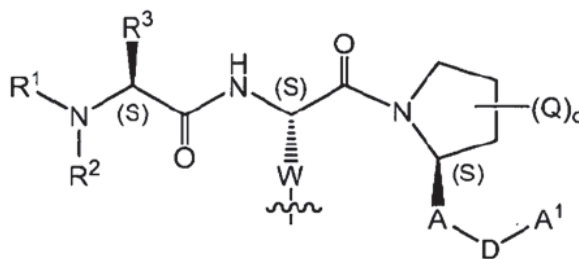
50

puede significar la cantidad de ARNm en una muestra de un individuo que tiene el cáncer en relación con una muestra de control o una serie de muestras de control. En otro ejemplo, un nivel de expresión superior de uno de los tres genes (TNF, RIPK1 o STK39) correspondientes al otro dentro de una muestra de un individuo que tiene cáncer seleccionará aquellos individuos que tengan cánceres en donde los inhibidores de IAP son probablemente más efectivos terapéuticamente.

En otra realización, la invención incluye determinar la expresión de ARNm de por lo menos dos marcadores seleccionados del grupo que consiste en STX39, CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, y MAPK14. En un ejemplo, los dos marcadores son CCL5 y STK39. En aún otro ejemplo, la invención incluye la determinación de un nivel de expresión de STK39.

10 Inhibidores de IAP

Ejemplos de inhibidores de IAP para su uso en la presente divulgación incluyen cualquier inhibidor de IAP. En un ejemplo, la invención incluye un compuesto de la fórmula M-L-M', donde M y M' son cada uno independientemente una unidad estructural monomérica de la Fórmula (I)



(I)

15 en donde:

R¹ es alquilo(C₁-C₄) o hidrógeno;

R² es hidrógeno, alquilo(C₁-C₄), alquilo(C₁-C₄) halo- sustituido, cicloalquilo(C₃-C₆), -CH₂-cicloalquilo(C₃-C₆), bencilo, HO-alquilo(C₁-C₄)-, o CH₃NH C(O)-;

R³ es alquilo(C₁-C₄), alquilo(C₁-C₄) halo-sustituido, o hidrógeno;

20 o R² junto con el átomo de nitrógeno al cual se fija R² es tomado junto con R³ para formar un anillo heterocíclico de 3 a 6 miembros que opcionalmente contiene de 1 a 2 átomos de anillo hetero adicionales cada uno independientemente seleccionado entre N, O y S;

25 Q es alquilo(C₁-C₄), alcoxilo(C₁-C₄), -OH, -C(O)-alquilo(C₁-C₄), -O-C(O)-alquilo(C₁-C₄), -NH₂, -NH-alquilo(C₁-C₄), -N(alquilo(C₁-C₄))₂, -NH-C(O)-alquilo(C₁-C₄), -NHSOalquilo(C₁-C₄), -NHSO(fenilo), -N(alquilo(C₁-C₄))-SOalquilo(C₁-C₄), -N(alquilo(C₁-C₄))-SO(fenilo), -NHSO₂alquilo(C₁-C₄), -NHSO₂(fenilo), -N(alquilo(C₁-C₄))-SO₂alquilo(C₁-C₄), o -N(alquilo(C₁-C₄))-SO₂(fenilo);

o es 0, 1, o 2;

A es un anillo de heteroarilo de 6 miembros que contiene al menos un heteroátomo de anillo N;

30 D es un enlace, -C(O)-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -N(alquilo(C₁-C₄))-, -N(alquilo(C₁-C₄)-OH)-, -N(cicloalquilo(C₃-C₆))-, -NHC(O)-, -N(alquilo(C₁-C₄))C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)-N(alquilo(C₁-C₄))-, -N(alquilo(C₁-C₄))-CO₂-alquilo(C₁-C₄))-, -alquilen(C₁-C₄), alquilen(C₂-C₆), -CH(OH)-, -C(O)-alquilen(C₁-C₄), -NH-alquilen(C₁-C₄), -S-alquilen(C₁-C₄), -S(O)-alquilen(C₁-C₄), -SO₂-alquilen(C₁-C₄), -NHSO₂alquilen(C₁-C₄), -NHSOalquilen(C₁-C₄), o -CH(R)-, donde R es NH₂, -NH(alquilen(C₁-C₄))fenilo, -NHalquilo(C₁-C₄), -O(alquilen(C₁-C₄))fenilo o -Oalquilo(C₁-C₄), en donde dicho (alquilen(C₁-C₄))fenilo o alquilo(C₁-C₄) está
35 opcionalmente sustituido por halo;

A¹ es H, CF₃, fenilo, naftilo, un cicloalquilo(C₃-C₆) parcial o completamente saturado, un heterociclo parcial o completamente saturado de 5 a 12 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno

independientemente seleccionado a partir de O, S o N, o un heteroarilo de 5 a 10 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado de O, S o N,

en donde dicho fenilo, naftilo y dicho heteroarilo están opcionalmente sustituidos por 1 a 3 sustituyentes cada uno independientemente seleccionados de halo, alquilo(C₁-C₄), alquilo(C₁-C₄) halo- sustituido, alcoxilo(C₁-C₄), -C(O)NHCH₃, -C(O)N (CH₃)₂, CN, o NO₂, y

donde dicho heterociclo y dicho cicloalquilo están opcionalmente fusionados a un fenilo o heteroarilo de 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, y donde dicho heterociclo, dicho cicloalquilo, dicho heterociclo fusionado y dicho cicloalquilo fusionado están opcionalmente sustituidos por oxo, halo, alquilo(C₁-C₄), alquilo(C₁-C₄) halo-sustituido, o alcoxilo(C₁-C₄);

- 10 W es un enlace, alquilenilo(C₁-C₁₀), alquenilenilo(C₁-C₁₀), (alquilenilo(C₁-C₄))_m-(Y)_n-B, (alquenilenilo(C₁-C₄))_m-(Y)_n-B, donde m y n son cada uno independientemente 0 o 1, Y es fenileno, naftileno, un cicloalquilenilo parcial o completamente saturado de 3 a 6 miembros, heterociclino parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado de O, S o N, o un heteroarileno de 5 a 10 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S, o N, y B es un enlace, -O-, alquilenilo(C₁-C₄), o-(CH₂)(fenileno),

- 15 donde dicha unidad estructural de alquilenilo(C₁-C₁₀), alquenilenilo(C₁-C₁₀), alquilenilo(C₁-C₄), o alquenilenilo(C₁-C₄) opcionalmente contiene un átomo de oxígeno o de nitrógeno intercalado dentro de la cadena de alquilenilo y está opcionalmente sustituido por oxo, -CF₃, fenilo, naftilo, un heteroarilo de 5 a 10 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S, o N, un cicloalquilo parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros, un heterociclo parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, y/o 1 o más halo,

donde dicho heterociclino parcial o completamente saturado está opcionalmente sustituido por 1 a 2 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado de oxo, alquilo(C₁-C₄), o halo,

- 25 donde dicho heteroarilo o dicho heteroarileno está opcionalmente sustituido por 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halo o alquilo(C₁-C₄), y

donde dicho fenileno, dicho fenilo, dicho naftilo, dicho naftileno, dicho cicloalquilenilo, o dicho cicloalquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado a partir de halo, -CF₃, alquilo(C₁-C₄), o alcoxilo(C₁-C₄),

- 30 o cuando W es (alquilenilo(C₁-C₄))_m-(Y)_n-B o (alquenilenilo(C₁-C₄))_m-(Y)_n-B y L es NR⁵-C(O)-X²-C(O)-NR⁵- o -NR⁵-S(O)₂-X²-S(O)₂-NR⁵-, B es opcionalmente tomado junto con R⁵ junto con el nitrógeno al cual R⁵ se fija para formar un anillo heterocíclico seleccionado del grupo que consta de aziridinilo, azetidino, pirrolidinilo, 1 H-pirrolilo, piperidinilo, 1H-indolilo, indolinilo, 1H-dihidroimidazolilo, 1H-imidazolilo, piperazinilo, hexahidropirimidinilo, 1,2,3,4-tetrahydroquinolinilo, 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinilo, 5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-b]pirazinilo, oxazolidinilo, y tiazolidinilo, donde dicho anillo heterocíclico está opcionalmente sustituido por 1 a 3 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado entre alquilo(C₁-C₄), -OH, u oxo;

L es un grupo enlazador seleccionado del grupo que consiste de -C(O)-NR⁵-X¹-NR⁵-C(O)-, -S(O)₂-NR⁵-X¹-NR⁵-S(O)₂-, -NR⁵-C(O)-X²-C(O)-NR⁵-, y -NR⁵-S(O)₂-X²-S(O)₂-NR⁵-,

donde R⁵ es hidrógeno, (C₁-C₄)alquilo, bencilo, o ciclohexilo; y

- 40 X¹ es

(i) un enlace,

(ii) alquilenilo(C₁-C₁₀), alquenilenilo(C₂-C₁₀), alquinilenilo(C₂-C₁₀), (alquilenilo(C₁-C₁₀))-(O-alquilenilo(C₁-C₆))_p-, o alquilenilo(C₁-C₁₀)-NH-alquilenilo(C₁-C₆), donde p es 0, 1 o 2,

- 45 (iii) fenileno, naftileno, fluorenileno, 9H-fluoren-9-onileno, 9,10-dihidroantracenileno, antracen-9,10-dionileno, un (C₃-C₈)cicloalquilenilo parcial o completamente saturado, un heterociclino de 5 a 7 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S, o N, o un heteroarileno de 5 a 10 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionados entre O, S o N, donde dicho fenileno está opcionalmente fusionado a un cicloalquilo(C₅-C₆),

(iv) (fenileno)-G-(fenileno), donde G es un enlace, O, S, -NH-, -N=N-, -S=S-, -SO₂-, alquilenilo(C₁-C₆), alquilenilo(C₂-C₆), alquilenilo(C₂-C₁₀), cicloalquilenilo(C₃-C₆), un heteroarilo de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heterociclono de 5 a 6 miembros parcial o completamente saturado que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, y donde dicho fenileno está opcionalmente fusionado a un fenilo,

(v) (alquilenilo(C₁-C₆))_r-Z¹-(alquilenilo(C₁-C₆))_s, o (alquilenilo(C₁-C₆))_r-Z¹-(alquilenilo(C₁-C₆))_s, donde r y s son cada uno independientemente 0, 1, o 2; y Z¹ es -O-, -N=N-, cicloalquilenilo(C₃-C₆), fenileno, un heterociclono parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heteroarileno de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, donde dicho heteroarileno y dicho heterociclono están opcionalmente fusionados a un fenilo, fenileno, un heterociclono parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heteroarileno de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o

(vi) alquilenilo(C₁-C₂₀) o -NH-(alquilenilo(C₁-C₂₀))-NH-, donde dicho alquilenilo contiene de 1 a 6 átomos de oxígeno intercalados dentro de la cadena de alquilenilo y opcionalmente de 1 a 2 grupos fenileno intercalados dentro de la cadena de alquilenilo;

o X¹ es opcionalmente tomado junto con ambos grupos R⁵ junto con el nitrógeno al cual ambos grupos R⁵ están fijados para formar un 2,6-diazaespiro[3.3]heptano;

X² es

(i) un enlace u -O-, -NH-, o -N(alquilo(C₁-C₄))-,

(ii) alquilenilo(C₁-C₁₀), -(O-alquilenilo(C₁-C₆))_p-, -(alquilenilo(C₁-C₆))_q-, -O-(alquilenilo(C₁-C₆))_q-, alquilenilo(C₂-C₁₀), (alquilenilo(C₁-C₁₀))-O(alquilenilo(C₁-C₆))_p-, -O-(alquilo(C₁-C₁₀))-O-, o alquilenilo(C₁-C₁₀)-NH-alquilenilo(C₁-C₆) o alquilenilo(C₂-C₁₀), donde p y q son cada uno independientemente 1, 2, o 3,

(iii) fenileno, naftileno, fluorenileno, 9H-fluoren-9-onileno, 9,10-dihidroantracenileno, antracen-9,10-dionileno, un (C₃-C₈)cicloalquilenilo parcial o completamente saturado, un heterociclono de 5 a 7 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S, o N, o un heteroarileno de 5 a 10 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionados entre O, S o N, donde dicho fenileno está opcionalmente fusionado a un cicloalquilo(C₅-C₆),

(iv) (fenileno)-G-(fenileno), o -O-(fenileno)-G-(fenileno)-O- donde G es un enlace, O, S, -NH-, -N=N-, -S=S-, -SO₂-, (C₁-C₆)alquilenilo, (C₂-C₆)alquilenilo, (C₃-C₆)cicloalquilenilo, un heteroarilo de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heterociclono de 5 a 6 miembros parcial o completamente saturado que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, y donde dicho fenileno está opcionalmente fusionado a un fenilo,

(v) (alquilenilo(C₁-C₆))_r-Z¹-(alquilenilo(C₁-C₆))_s, (alquilenilo(C₁-C₆))_r-Z¹-(alquilenilo(C₁-C₆))_s, o -(O-alquilenilo(C₁-C₃))_u-Z²-(alquilenilo(C₁-C₃))_v-, donde r, s, u, y v son cada uno independientemente 0, 1, o 2; y Z¹ y Z² son -O-, -N=N-, cicloalquilenilo(C₃-C₆), fenileno, un heterociclono parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heteroarileno de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, donde dicho heteroarileno y dicho heterociclono están opcionalmente fusionados a un fenilo, fenileno, un heterociclono parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heteroarileno de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o

(vi) alquilenilo(C₁-C₂₀) o -NH-(alquilenilo(C₁-C₂₀))-NH-, donde dicho alquilenilo contiene de 1 a 6 átomos de oxígeno intercalados dentro de la cadena de alquilenilo y opcionalmente de 1 a 2 grupos fenileno intercalados dentro de la cadena de alquilenilo;

donde dichas unidades estructurales del grupo (ii) de X¹ y X² son cada una independientemente sustituidas con uno o más átomos de fluoro, o 1 a 2 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado entre halo, oxo, amino, fenilo, naftilo, cicloalquilo(C₃-C₆), o heterociclono de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, N o S, donde dicho fenilo, dicho cicloalquilo, y dicho heterociclono están opcionalmente sustituidos por 1 a 3 sustituyentes cada uno

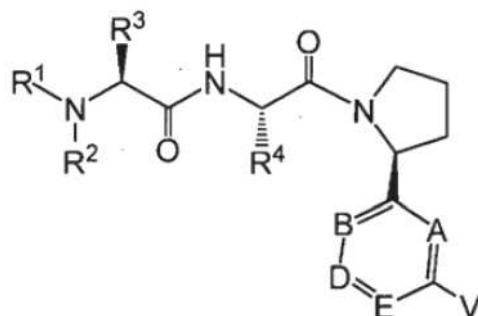
independientemente seleccionado entre halo, alquilo(C₁-C₄), o trifluorometilo,

5 en donde dichas unidades estructurales de grupo (iii) y (iv) de X¹ y X² son opcionalmente sustituidas con 1 a 4 sustituyentes cada uno independientemente seleccionados de alquilo(C₁-C₄), alcoxilo(C₁-C₄), halo, amino, -OH, bencilo, o un cicloalquilo fusionado de 5- a 6-miembros, donde dicho alquilo(C₁-C₄), dicho alcoxilo(C₁-C₄), y dicho cicloalquilo fusionado están opcionalmente sustituidos por 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halo, alquilo(C₁-C₄),

donde dichas unidades estructurales del grupo (v) de X¹ y X² son opcionalmente sustituidas por 1 a 3 sustituyentes cada uno independientemente seleccionados a partir de halo, hidroxilo, oxo, amino, alquilo(C₁-C₄), alcoxilo(C₁-C₄), o fenilo;

10 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otro ejemplo, el compuesto inhibidor de IAP puede ser un compuesto de la fórmula M-L-M', en donde M y M' son cada uno, de manera independiente, una unidad estructural monomérica de la fórmula (I):



(I)

en donde,

15 R¹ es alquilo(C₁-C₄), metilo deuterado, o hidrógeno;

R² es alquilo(C₁-C₄) o hidrógeno;

R³ es alquilo(C₁-C₄) o hidrógeno; o

R¹ o R² junto con el nitrógeno el cual R¹ o R² se fijan es tomado junto con R³ para formar un aziridinilo, azetidínulo, piperidinilo, o piperidinilo;

20 R⁴ es

(i) alquilo (C₁-C₁₀), alqueno (C₂-C₁₀), alquino (C₂-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₆), fenilo, un heterociclo de 3 a 7 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente entre O, N o S, o un heteroarilo de 5 a 9 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente a partir de O, N o S, o

25 (ii) R^{4a}-alqueno (C₁-C₆), donde R^{4a} es cicloalquilo (C₃-C₆), fenilo, un heterociclo de 3 a 7 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente entre O, N o S, o un heteroarilo de 5 a 9 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente a partir de O, N o S,

30 donde dicho R⁴ y dicho R^{4a} están opcionalmente sustituidos por 1 a 3 sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxilo, -SH, -CO₂H, alquilo (C₁-C₄), alquilo (C₁-C₄) halo-sustituido, alcoxilo (C₁-C₄), alquilo-(C₁-C₄) -S, -SO₂, -NH₂ o -NO₂, y donde 1 de los miembros del anillo de dicho cicloalquilo y dichas unidades estructurales de heterociclo son opcionalmente sustituidas por oxo o tiona;

A, B, y D son CR⁵, y E es N,

A, B, y E son CR⁵, y D es N,

A, D, y E son CR⁵, y B es N,

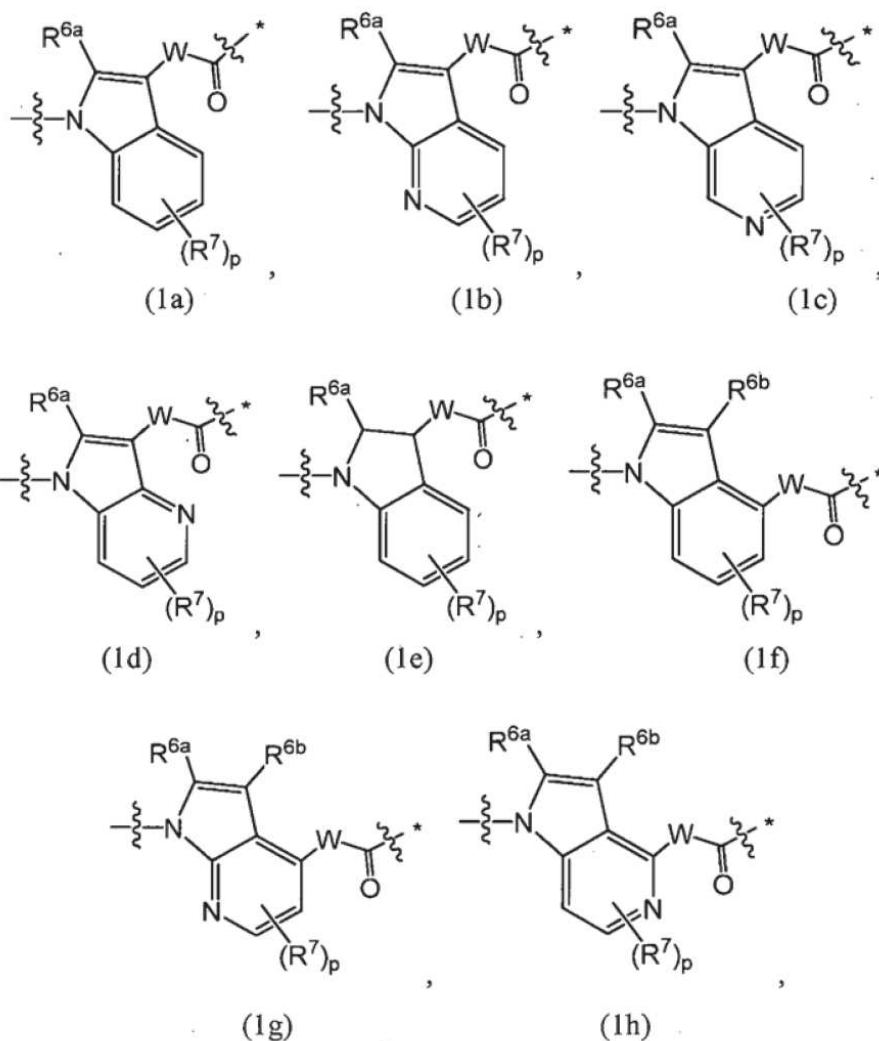
B, D, y E son CR⁵, y A es N,

A y B son ambos N, y D y E son ambos CR⁵,

5 A y E son ambos N, y B y D son ambos CR⁵, o

B y E son ambos N, y A y D son ambos CR⁵, donde R⁵ son cada uno independientemente seleccionados a partir de H, F, -CH₃ o -CF₃;

V se selecciona a partir de la Fórmula (1a), (1b), (1c), (1d), (1e), (1f), (1g), (1h), (1i), (1j), o (1k)



un (C₃-C₈)cicloalquileo parcial o completamente saturado, un heterociclono de 5 a 7 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S, o N, o un heteroarileno de 5 a 10 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionados entre O, S o N, donde dicho fenileno está opcionalmente fusionado a un (C₅-C₆)cicloalquilo,

5 (iv) (fenileno)-G-(fenileno), donde G es un enlace, O, S, -NH-, -N=N-, -S=S-, -SO₂-, alquileo(C₁-C₆), alquenileno (C₂-C₆), alquenileno (C₂-C₁₀), cicloalquileo (C₃-C₆), un heteroarilo de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heterociclono de 5 a 6 miembros parcial o completamente saturado que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, y donde dicho fenileno está opcionalmente fusionado a un fenilo,

15 (v) (alquileo(C₁-C₆))_r-Z¹-(alquileo(C₁-C₆))_s, o (alquenileno (C₁-C₆))_r-Z¹-(alquenileno(C₁-C₆))_s, donde r y s son cada uno independientemente 0, 1, o 2; y Z¹ es -O-, -N=N-, cicloalquileo (C₃-C₆), fenileno, un heterociclono parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heteroarileno de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, donde dicho heteroarileno y dicho heterociclono están opcionalmente fusionados a un fenilo, fenileno, un heterociclono parcial o completamente saturado de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o un heteroarileno de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, S o N, o

20 (vi) alquileo (C₁-C₂₀) o -NH-(alquileo(C₁-C₂₀))-NH-, donde dicho alquileo contiene de 1 a 6 átomos de oxígeno intercalados dentro de la cadena de alquileo y opcionalmente de 1 a 2 grupos fenileno intercalados dentro de la cadena de alquileo;

25 o X¹ se toma opcionalmente junto con uno o ambos grupos R⁸ junto con el nitrógeno al cual el grupo R⁸ está unido para formar un heterociclono de 4 a 14 miembros, (heterociclilo de 4 a 6 miembros)-alquileo(C₁-C₆) - (heterociclilo de 4 a 6 miembros), o bis-(heterociclono de 4 a 6 miembros, donde dicho heterociclono y dichas unidades estructurales de heterociclilo opcionalmente contienen de 1 a 3 heteroátomos adicionales seleccionados a partir de O, S y N, y X¹ y R⁸ están opcionalmente sustituidos por oxo o 1 a 3 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidroxilo o alquilo (C₁-C₄);

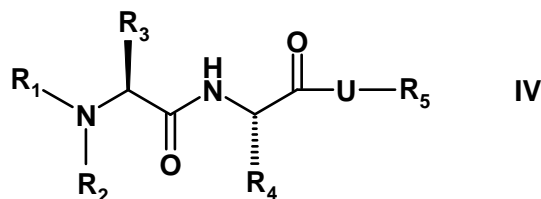
30 donde dichas unidades estructurales del grupo (ii) de X¹ son cada una independientemente sustituidas por uno o más átomos de fluro, o 1 a 2 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado entre halógeno, oxo, amino, fenilo, naftilo, cicloalquilo (C₃-C₆) , o heterociclo de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos cada uno independientemente seleccionado entre O, N o S, donde dicho fenilo, dicho cicloalquilo, y dicho heterociclo están opcionalmente sustituidos por 1 a 3 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado a partir de halógeno, alquilo (C₁-C₄), o trifluorometilo,

35 en donde dichas unidades estructurales de grupo (iii) y (iv) de X¹ son opcionalmente sustituidas con 1 a 4 sustituyentes cada uno independientemente seleccionados de alquilo (C₁-C₄), alcoxilo (C₁-C₄), halógeno, amino, -OH, bencilo, o un cicloalquilo fusionado de 5- a 6-miembros, donde dicho alquilo (C₁-C₄), dicho alcoxilo (C₁-C₄), y dicho cicloalquilo fusionado están opcionalmente sustituidos por 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halo, alquilo (C₁-C₄),

40 donde dichas unidades estructurales del grupo (v) de X¹ son opcionalmente sustituidas por 1 a 3 sustituyentes cada uno independientemente seleccionados a partir de halógeno, hidroxilo, oxo, amino, alquilo (C₁-C₄), alcoxilo (C₁-C₄), o fenilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En aún otro ejemplo, el compuesto del inhibidor de IAP puede incluir un compuesto de la fórmula (IV)



45

en donde

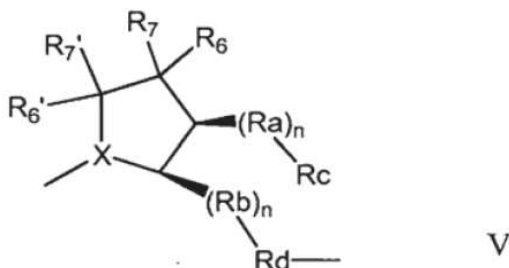
R₁ y R₃ son cada uno, independientemente metilo o etilo;

R₂ es H, metilo, etilo, clorometilo, diclorometilo o trifluorometilo;

R₄ es alquilo C₁-C₄ o cicloalquilo C₃-C₇;

R₅ es H;

5 U es una estructura de la fórmula (V)



donde

(a)

X es N;

10 R₆, R₆', R₇ y R₇' son H;

R_a y R_b son independientemente un átomo de O, S, o N o alquilo C₀₋₈ en donde uno o más de los átomos de carbono en la cadena de alquilo puede estar sustituido por un heteroátomo seleccionado a partir de O, S o N, y donde el alquilo está no sustituido o sustituido;

n es 0;

15 R_c es H;

R_d es Ar₁-D-Ar₂, donde Ar₁ y Ar₂ son cada uno independientemente un fenilo o het, sustituido o no sustituido, y D es alquilo C₁ que está opcionalmente sustituido con halógeno, donde el fenilo o het de Ar₁ está unido a ambos (R_b)_n y D, y el fenilo o el het de Ar₂ está unido a ambos D y R⁵;

(b)

20 X es N;

R₆, R₆', R₇, y R₇' son H; o

R₆ es -C(O)-alquiloC₁-C₄-fenilo y R₆', R₇, y R₇' son H;

25 R_a y R_b son independientemente un átomo de O, S, o N o alquilo C₀₋₈ en donde uno o más de los átomos de carbono en la cadena de alquilo puede estar sustituido por un heteroátomo seleccionado a partir de O, S o N, y donde el alquilo está no sustituido o sustituido;

n es 0;

R_c es H;

30 R_d es Ar₁-D-Ar₂, donde Ar₁ y Ar₂ son cada uno independientemente un fenilo o het sustituido o no sustituido, y D es N(Rh), donde Rh es H, Me, -CHO, -SO₂, -C(O), -CHOH, -CF₃ o -SO₂CH₃, donde el fenilo o het de Ar₁ está unido a ambos (R_b)_n y D, y el fenilo o het de Ar₂ está unido a ambos D y R⁵;

(c)

X es N;

R₆, R'₆, R₇, y R'₇ es H;

5 Ra y Rb son independientemente un átomo de O, S, o N o alquilo C₀₋₈ en donde uno o más de los átomos de carbono en la cadena de alquilo puede estar sustituido por un heteroátomo seleccionado a partir de O, S o N, y donde el alquilo está no sustituido o sustituido;

n es 0;

Rc es H;

10 Rd es Ar₁-D-Ar₂, donde Ar₁ y Ar₂ son cada uno independientemente un fenilo o het sustituido o no sustituido, y D es -O-, donde el fenilo o het de Ar₁ está unido a ambos (Rb)_n y D, y el fenilo o het de Ar₂ está unido a ambos D y R⁵; o

(d)

X es N;

R₆, R'₆, R₇, y R'₇ es H;

15 Ra y Rb son independientemente un átomo de O, S, o N o alquilo C₀₋₈ en donde uno o más de los átomos de carbono en la cadena de alquilo puede estar sustituido por un heteroátomo seleccionado a partir de O, S o N, y donde el alquilo está no sustituido o sustituido;

n es 0;

Rc es H;

20 Rd es Ar₁-D-Ar₂, donde Ar₁ y Ar₂ son cada uno independientemente un fenilo o het sustituido o no sustituido, y D es S, S(O), o S(O)₂, donde el fenilo o het de Ar₁ está unido a ambos (Rb)_n y D, y el fenilo o het de Ar₂ está unido a ambos D y R⁵;

(e)

X es N;

25 R₆, R'₆, R₇, y R'₇ es H;

Ra y Rb son independientemente un átomo de O, S, o N o alquilo C₀₋₈ en donde uno o más de los átomos de carbono en la cadena de alquilo puede estar sustituido por un heteroátomo seleccionado a partir de O, S o N, y donde el alquilo está no sustituido o sustituido;

n es 0;

30 Rc es H;

Rd es Ar₁-D- Ar₂;

Ar₁ y Ar₂ son cada uno independientemente un fenilo o het sustituido o no sustituido, y D es C(O), donde el fenilo o het de Ar₁ está unido a ambos (Rb)_n y D, y el fenilo o het de Ar₂ está unido a ambos D y R⁵;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

35 Los ejemplos específicos de los compuestos incluyen:

(S,S,S)-N,N'-(3,3'-(etano-1,2-diilbis(oxi))bis(propano-3,1-diil))bis(1-(5-((S)-1-((S)-3-metil-2-((S)-2-(metilamino)-propanamido)butanoil)pirrolidin-2-il)piridin-3-il)-1H-indol-4-carboxamida);

(S,S,S)-N,N'-(1,4-fenilen-bis-(metileno))bis(1-(5-((S)-1-((S)-3-metil-2-((S)-2-(metilamino)propanamido)butanoil)pirrolidin-2-il)piridin-3-il)-1H-indol-4-carboxamida);

(S,S,S)-N,N'-(propano-1,3-diil)bis(1-(5-((S)-1-((S)-3-metil-2-((S)-2-(metilamino)propanamido)butanoil)pirrolidin-2-il)piridin-3-il)-1H-indol-4-carboxamida);

5 (S,S,S)-N,N'-((1S,2S)-ciclohexano-1,2-diil)bis(1-(5-((S)-1-((S)-3-metil-2-((S)-2-(metilamino)propanamido)butanoil)pirrolidin-2-il)piridin-3-il)-1H-indol-4-carboxamida); y

(S,S,S)-N,N'-(3,3'-(etano-1,2-diilbis(oxi))bis(propano-3,1-diil)bis(1-(5-((S)-1-((S)-3-metil-2-((S)-2-(trideuterometilamino)propanamido)butanoil)pirrolidin-2-il)piridin-3-il)-1H-indol-4-carboxamida);

10 bis-(((S)-6-((S)-2-[5-(4-fluoro-benzoil)-piridin-3-il]-pirrolidin-1-il)-5-((S)-2-metilamino-propionilamino)-6-oxo-hexil]-amida) del ácido bifenil-4,4'-dicarboxílico;

bis-(((S)-6-((S)-2-[5-(4-fluoro-benzoil)-piridin-3-il]-pirrolidin-1-il)-5-((S)-2-metilamino-propionilamino)-6-oxo-hexil]-amida) del ácido decanodioico;

bis-((4-[(S)-3-((S)-2-[5-(4-fluoro-benzoil)-piridin-3-il]-pirrolidin-1-il)-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-3-oxo-propil]-fenil)-amida) del ácido decanodioico;

15 bis-(((S)-6-((S)-2-[5-(4-fluoro-benzoil)-piridin-3-il]-pirrolidin-1-il)-5-((S)-2-metilamino-propionilamino)-6-oxo-hexil]-amida) del ácido nonanodioico;

bis-((4-[(S)-3-((S)-2-[5-(4-fluoro-benzoil)-piridin-3-il]-pirrolidin-1-il)-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-3-oxo-propil]-fenil)-amida) del ácido heptanodioico; y

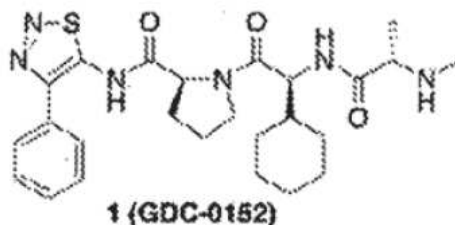
20 bis-((4-[(S)-3-((S)-2-[5-(4-fluoro-benzoil)-piridin-3-il]-pirrolidin-1-il)-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-3-oxo-propil]-fenil)-amida) del ácido nonanodioico;

(S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propión;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

25 Ejemplos de otros inhibidores de IAP incluyen los compuestos divulgados en el documento WO 05/097791 publicado el 20 de octubre de 2005, que se incorpora en la presente solicitud como referencia. Un compuesto preferido dentro del alcance de la fórmula (I) es la N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolo[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida, en lo sucesivo el compuesto II.

Ejemplos de otros inhibidores de IAP incluyen aquellos divulgados en WO2008134679 y US20060014700. En un ejemplo, el compuesto es GDC-0152.



30 Los inhibidores de IAP adicionales incluyen los compuestos descritos en el documento WO 04/005284, PCT/US2006 /013984, PCT/US2006/021850.

35 Otros compuestos inhibidores de IAP para su uso en la presente divulgación incluyen los divulgados en WO 06/069063, WO 05/069888, US2006/0014700, WO 04/007529, US2006/0025347, WO 06/010118, WO 05/069894, WO 06/017295, WO 04/007529, WO 05/094818.

Se comprenden también las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, los racematos

correspondientes, diaestereoisómeros, enantiómeros, tautómeros, así como las correspondientes modificaciones cristalinas de los compuestos anteriormente divulgados cuando están presentes, por ejemplo, solvatos, hidratos y polimorfos, que se divulgan en la presente. Los compuestos usados como ingredientes activos en las combinaciones de la divulgación pueden prepararse y administrarse como se describe en los documentos citados, respectivamente. También dentro del alcance de esta divulgación está la combinación de más de dos ingredientes activos independientes como se ha expuesto anteriormente, es decir, una combinación farmacéutica dentro del alcance de esta divulgación podría incluir tres ingredientes activos o más.

Preparación de las muestras

Se puede utilizar cualquier muestra de ensayo apropiada de células tomadas a partir de un individuo que tenga una enfermedad proliferativa. Generalmente, la muestra de ensayo de células o muestra de tejido se obtiene a partir del sujeto con cáncer mediante biopsia o resección quirúrgica. Una muestra de células, tejido o fluido se puede eliminar mediante biopsia de aspiración con aguja. Para esto, una aguja fina unida a una jeringa se inserta a través de la piel y en el tejido de interés. La aguja es típicamente guiada a la región de interés utilizando imágenes de ultrasonido o de tomografía computarizada (TC). Una vez que la aguja se inserta en el tejido, se crea un vacío con la jeringa de tal manera que las células o fluidos pueden ser aspirados a través de la aguja y se recogen en la jeringa. Una muestra de células o tejido también puede ser eliminada por una biopsia de incisión o de núcleo en el tejido. Para ello, un cono, un cilindro, o un poco de tejido se extrae de la región de interés. Imágenes de TC, ultrasonido, o un endoscopio se utilizan generalmente para guiar este tipo de biopsia. Más particularmente, la totalidad de la lesión cancerosa se puede eliminar mediante biopsia por escisión o resección quirúrgica. En la presente invención, la muestra de ensayo es típicamente una muestra de células retiradas como parte de la resección quirúrgica.

La muestra de ensayo de, por ejemplo tejido, también puede almacenarse en, por ejemplo, ARNlater (Ambion; Austin, Texas) o se congela rápidamente y se almacena a -80°C para su uso posterior. La muestra de tejido de biopsia también se puede fijar con un fijador, tal como formaldehído, paraformaldehído, o ácido acético/etanol. La muestra fijada de tejido puede ser sumergida en cera (parafina) o una resina plástica. La muestra de tejido sumergida (o muestra de tejido congelada) puede cortarse en secciones delgadas. ARN o proteína también pueden ser extraídos de una muestra de tejido fijada o sumergida en cera o una muestra de tejido congelada. Una vez que una muestra de células o muestra de tejido se retira del sujeto con cáncer, ésta se puede procesar para el aislamiento de ARN o proteína utilizando técnicas bien conocidas en la técnica y como se describe a continuación.

Un ejemplo de extracción de ARN a partir de una biopsia tomada de un paciente con cáncer puede incluir, por ejemplo, lisis de tiocianato de guanidinio seguido de centrifugación CsCl (Chirgwin, *Biochemistry* 18:5294-5299, 1979). ARN a partir de células individuales puede obtenerse como se describe en los métodos para la preparación de bibliotecas de ADNc a partir de células individuales (véase, por ejemplo, Dulac, *Curr. Top. Dev. Biol.* 36:245, 1998; Jena, *J. Immunol. Methods* 190:199, 1996). En una realización, la población de ARN puede ser enriquecida para las secuencias de interés, como se detalla en la Tabla 1. El enriquecimiento se puede conseguir, por ejemplo, mediante hexámeros aleatorios y la síntesis de ADNc específica a cebador, o múltiples rondas de amplificación lineal basada en la síntesis de ADNc y una transcripción *in vitro* dirigida por un templete (véase, por ejemplo, Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9717, 1989; Dulac *supra*; Jena, anterior). Otros métodos de aislamiento de ARN a partir de una muestra son conocidos en la técnica e incluyen Trizol (Invitrogen), extracción de Guanidinio en tiocianato-fenol-cloroformo, Sistema de Purificación total de ARN PureLink Micro-a-Midi (Invitrogen), kit RNeasy (Qiagen), kit Oligotex (Qiagen), PureYield™ RNA Midiprep (Promega), Sistema PolyATtract 1000 (Promega), sistema Maxwell® 16 (Promega), aislamiento total de ARN SV (Promega), Kit ToTALLY RNA™ (Ambion), Kit Poly(A)Purist™ (Ambion) y cualquier otro método. Métodos para extraer y analizar una muestra de ARN se divulgan en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Sambrook y Russell (ed.), 3ra edición (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EUA).

El perfil de expresión de ARNm se puede realizar en una biopsia tomada de un sujeto tal como tejido fresco, tejido congelado, tejido procesado en formalina (FFPE) u otros fijadores. En particular, cuando la muestra es una muestra FFPE, el ARN se extrae a partir de secciones de FFPE utilizando el kit de extracción de Qiagen RNeasy FFPE (Qiagen), y transcripción inversa a ADNc utilizando hexámeros aleatorios y el kit de archivo de ADNc de alta capacidad de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El sujeto con un tumor o cáncer será generalmente un sujeto mamífero, tal como un primate. En una realización de ejemplo, el sujeto es un ser humano. Tal como se utiliza en la presente, los términos paciente y sujeto son sinónimos.

Cualquier tipo de cáncer o tumor se pueden clasificar según los métodos de la invención e incluyen, pero no se limitan a, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de próstata y

carcinoma hepatocelular, carcinoma de células basales, cáncer de mama, sarcoma óseo, sarcoma de tejidos blandos, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, cáncer hematológico, meduloblastoma, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, cáncer pancreático, cáncer de ovario, meningioma, glioblastoma, astrocitoma, melanoma, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer del tracto biliar, cáncer de próstata, 5 cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células gliales, mieloma múltiple, cáncer de colon, tumor neuroectodérmico, tumor neuroendocrino, mastocitoma y el síndrome de Gorlin, glioma, cáncer colorrectal, GIST, cáncer gastro-esofágico, neoplasia mieloproliferativa y una leucemia aguda.

Detección de la expresión del biomarcador

10 En un ejemplo, el método incluye la determinación de la expresión de tres o más de los genes CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1 en una muestra de interés. Específicamente, la invención incluye la determinación de un nivel de expresión de TNF y RIPK1 y uno o más de los siguientes biomarcadores CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39 y MAPK14 en la muestra de interés. En otro 15 ejemplo, la invención incluye la determinación de un nivel de expresión de STK39 y CCL5. En aún otro ejemplo, la invención incluye la determinación de un nivel de expresión de STK39. Las secuencias de genes de interés se pueden detectar usando agentes que se pueden utilizar para detectar específicamente el gen, por ejemplo, el ARN transcrito a partir del gen o polipéptidos codificados por el gen.

En una realización, el método incluye: proporcionar una sonda de ácido nucleico que comprende una 20 secuencia de nucleótidos, por ejemplo, al menos 10, 15, 25 o 40 nucleótidos, y hasta la totalidad o casi la totalidad de la secuencia de codificación que es complementaria a una porción de la secuencia de codificación de una secuencia de ácidos nucleicos de CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1; obteniendo una muestra de tejido de un mamífero que tiene una célula cancerosa; poner en contacto la sonda de ácido nucleico bajo condiciones rigurosas con ARN obtenido de una biopsia tomada de un 25 paciente con cáncer (por ejemplo, en una inmunoprecipitación Northern, en el ensayo de hibridación in situ, PCR, etc.); y determinar la cantidad de hibridación de la sonda con el ARN. Los ácidos nucleicos pueden estar marcados durante o después del enriquecimiento y/o la amplificación de los ARN.

Los biomarcadores CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1 pretenden 30 también incluir secuencias de origen natural incluyendo variantes alélicas y otros miembros de la familia. Los biomarcadores de la invención también incluyen secuencias que son complementarias a las secuencias enumeradas resultantes de la degeneración del código y también secuencias que son suficientemente homólogas y secuencias que se hibridan bajo condiciones rigurosas con los genes de la invención.

Las condiciones para la hibridación son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en 35 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley e Hijos, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido no limitante de condiciones de hibridación altamente rigurosas son hibridación en cloruro de sodio 6 X/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 grados centígrados, seguido de uno o más lavados en SSC 0.2 X, SDS al 0,1 por ciento a 50-65 grados centígrados. Por "suficientemente homóloga" se entiende una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de un marcador biológico que contiene un número suficiente o mínimo de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, un residuo de aminoácido que 40 tiene una cadena lateral similar) a una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos de tal manera que la primera y segunda secuencias de aminoácidos o nucleótidos comparten motivos o dominios estructurales comunes y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos o nucleótidos que comparten dominios estructurales comunes tienen al menos aproximadamente 50 por ciento de homología, al menos aproximadamente 60 por ciento de homología, al menos aproximadamente 70 por ciento, al menos 45 aproximadamente 80 por ciento, y al menos aproximadamente el 90-95 por ciento de homología a través de las secuencias de aminoácidos de los dominios se definen aquí como suficientemente homólogas. Además, las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de al menos aproximadamente 50 por ciento de homología, al menos aproximadamente 60-70 por ciento de homología, al menos aproximadamente 70-80 por ciento, al menos aproximadamente 80-90 por ciento, y al menos aproximadamente 90-95 por ciento de homología y que comparten una actividad funcional común se definen en la presente como suficientemente homólogas.

50 La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, (1990) J. Mol. Biol. 55 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos TRL de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las secuencias de proteínas codificadas por los genes/oligonucleótidos enumerados en la Tabla 1. Para obtener

5 alineaciones con brechas para propósitos de comparación, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul, (1997) Nucleic Acids Research 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ALIGN de Myers y Miller, CABIOS (1989). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se pueden utilizar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización por brecha de 4.

10 La presente invención incluye la medición de la expresión de tres o más genes CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1 en una biopsia de tumor tomada de un sujeto que sufre de cáncer. Los niveles de expresión pueden ser analizados y utilizados para generar una puntuación que se puede utilizar para diferenciar aquellos pacientes que tienen un tumor que es probable que sea sensible a un inhibidor de IAP en comparación con aquellos que son propensos a no serlo.

15 En una realización, el método de la invención incluye la medición de cualesquiera tres genes de CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1 enumerados en la Tabla 1. En otra realización, el método de la invención incluye la medición de al menos al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, o por lo menos ocho, o al menos nueve de los biomarcadores descritos en el presente documento.

Tabla 1

Símbolo oficial del gen HUGO	Nombre aprobado HUGO	HGNC ID	UGID	UniGene	Nivel de expresión
CXLC10	Ligando 10 de quimiocina (C-X C-grupo)	10637	UGID: 2139480	Hs.632586	Aumentado
CCL5	quimiocinas (motivo C-C) ligando 5	10632	UGID: 905568	Hs.514821	Aumentado
NFKBIA	Gen del Polipéptido ligero del factor kappa nuclear potenciador del inhibidor de células B, alfa	7797	UGID: 140532	Hs.81328	Aumentado
HERC5	HECT y el dominio RLD que contiene la proteína ligasa 5 de la ubiquitina 3	24368	UGID: 135264	Hs.26663	Aumentado
CDYL	Proteína cromodominio similar a Y	1811	UGID: 172621	Hs.269092	Aumentado
STK39	serina treonina cinasa 39	17717	UGID: 174166	Hs.276271	Disminuido

Símbolo oficial del gen HUGO	Nombre aprobado HUGO	HGNC ID	UGID	UniGene	Nivel de expresión
MAPK14	Proteína cinasa 14 activada por mitógeno	6876	UGID: 700392	Hs.485233	Aumentado
TNF	factor de necrosis tumoral	11892	UGID: 167910	Hs.241570	Aumentado
RIPK1	Proteína serina-treonina cinasa 1 que interactúa con el receptor (TNFRSF)	10019	UGID: 910589	Hs.519842	Aumentado

5 Los biomarcadores de la invención también incluyen cualquier combinación de los genes identificados en la Tabla 1 cuyo nivel de expresión o producto genético sirve como un biomarcador predictivo. Los biomarcadores de la invención, incluyendo su secuencia génica, son conocidos en la técnica.

10 En el método de la invención, el nivel de expresión de tres o más genes como se describe en la Tabla 1 se mide y se analiza y se compara con un control. El control para la comparación se puede determinar por un experto en la técnica. En un ejemplo, el control se determina por la elección de un valor que sirve como un valor de corte. Por ejemplo, el valor puede ser un valor que diferencia entre, por ejemplo, las muestras de prueba que tienen un aumento de tres o más genes como se describe en la Tabla 1 de las que no muestran un aumento en tres o más genes como se ha descrito. En otro ejemplo, el perfil de expresión génica de un biomarcador de la invención se compara con el perfil de expresión génica de un conjunto de control de muestras en las que los umbrales para la expresión alta y baja se han caracterizado (por ejemplo, como percentiles).

15 En una realización particular de la invención, el control está predeterminado y se genera una puntuación que se puede utilizar para seleccionar aquellos sujetos que tienen un tumor que es probable que muestre la capacidad de respuesta a un inhibidor de IAP.

20 Los biomarcadores de la invención se pueden medir utilizando cualquier método conocido en la técnica tal como PCR de la transcriptasa reversa (PCR-TR) El método incluye el aislamiento de ARNm utilizando cualquier técnica conocida en la técnica y descrita anteriormente, por ejemplo, mediante el uso de un kit de purificación, conjunto de reguladores y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen. El paso de transcripción inversa se realiza típicamente usando cebadores específicos, hexámeros aleatorios, o cebadores oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y la meta del perfilamiento de la expresión y el ADNc derivado luego se puede utilizar como una plantilla en la reacción PCR subsiguiente. Luego se puede realizar una prueba TaqMan(R) RT-PCR utilizando, por ejemplo, los equipos disponibles en el mercado.

30 El ARNm aislado se puede analizar entonces adicionalmente usando cualquier método conocido en la técnica tal como el análisis del micromatriz (microarray), PCR cuantitativa (en "tiempo real"), inmunoprecipitación Northern, y ensayo de protección de nucleasa. En un ejemplo, la PCR cuantitativa en tiempo real se usa para medir la acumulación de producto de PCR a través de una sonda fluorogénica doblemente marcada (por ejemplo, usando la sonda TaqMan (R)). PCR en tiempo real es compatible tanto con PCR competitiva cuantitativa, donde se utiliza competidor interno para cada secuencia objetivo para la normalización, y con la PCR comparativa cuantitativa usando un gen de normalización contenido en la muestra, o un gen constitutivo para la PCR-TR. Para detalles adicionales véase, por ejemplo Held, Genome Research 6:986-994 (1996). En un ensayo PCR en tiempo real una reacción positiva se detecta por la acumulación de una señal fluorescente. El Ct (umbral del ciclo) se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, excede el nivel de fondo). Los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico objetivo en la muestra (es decir, a menor nivel de Ct, mayor es la cantidad de ácido nucleico

objetivo en la muestra). La mayoría de los ensayos en tiempo real se someten a 40 ciclos de amplificación.

En otro ejemplo, se utilizan micromatrices, que incluyen una o más sondas correspondientes a tres o más de los genes CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1. El uso de una micromatriz resulta en la producción de patrones de hibridación de ácidos nucleicos objetivo marcados en la superficie del arreglo. Los patrones de hibridación resultantes de los ácidos nucleicos marcados se pueden visualizar o detectar en una variedad de maneras, con la forma particular de detección seleccionada en base a la etiqueta particular del ácido nucleico objetivo. Medios de detección representativos incluyen recuento de centelleo, autorradiografía, medición de fluorescencia, medición calorimétrica, medición de emisión de luz, dispersión de luz, y similares.

En otro ejemplo, se puede utilizar una tarjeta de un Arreglo de Baja Densidad TaqMan® (TLDA) se puede utilizar, la cual puede incluir una o más sondas correspondientes a tres o más de los genes CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39, MAPK14, TNF y RIPK1. Este método utiliza una tarjeta de microfluidos que realiza reacciones PCR simultáneas en tiempo real.

En un ejemplo, el método de detección utiliza un escáner del arreglo que está disponible comercialmente (Affymetrix, Santa Clara, Calif.), por ejemplo, el 417Arrayer, el 418Array Scanner, o el Agilent GeneArray Scanner. Este escáner se controla desde un ordenador del sistema con una interfaz y herramientas de software fáciles de usar. La salida se puede importar directamente a o leer directamente por una variedad de aplicaciones de software. Dispositivos de escaneo se describen en, por ejemplo, EE.UU. Pat. Nos. 5.143.854 y 5.424.186.

Análisis de datos:

Para facilitar la operación de análisis de muestras, los datos obtenidos por el lector desde el dispositivo pueden ser analizados mediante un ordenador digital. Típicamente, el ordenador se puede programar adecuadamente para la recepción y almacenamiento de los datos desde el dispositivo, así como para el análisis y la comunicación de los datos recogidos, por ejemplo, la sustracción de los antecedentes, la verificación de que los controles se han realizado correctamente, la normalización de las señales, la interpretación de los datos de fluorescencia para determinar la cantidad de objetivo hibridado, normalización de fondo, y similares.

Kits

La invención proporciona además kits para la determinación del nivel de expresión de los biomarcadores descritos en el presente documento. Los kits pueden ser útiles para determinar quién se beneficiará del tratamiento con un inhibidor IAP. Un kit puede comprender sondas de genes identificados en la Tabla 1 se puede utilizar para medir la expresión génica de una muestra de prueba. En una realización, el kit comprende un medio legible por ordenador que incluye software de análisis de perfil de expresión capaz de ser cargado en la memoria de un sistema informático y que puede convertir los valores de expresión medidos en una puntuación de riesgo. Un kit puede comprender además controles de ácidos nucleicos, reguladores, e instrucciones para su uso.

Administración.

Los inhibidores de IAP descritos en este documento pueden administrarse selectivamente en cantidades terapéuticamente efectivas a través de cualquiera de los modos habituales y aceptables conocidos en la técnica, ya sea solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos basados en el individuo que se ha determinado es más propenso a responder a inhibidores de IAP con base en los biomarcadores divulgados en este documento. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar ampliamente dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto usado y otros factores.

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que se podrían utilizar en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no es de ninguna manera limitada a los métodos y materiales descritos. Para propósitos de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Biomarcadores para la respuesta de IAP

Se utilizó un marco estadístico que integra datos farmacológicos, junto con los datos genéticos y de expresión

de ARNm con el fin de desarrollar biomarcadores para predecir la respuesta a los inhibidores de IAP. El uso de los datos genómicos generados como parte de la colección de la Enciclopedia de Líneas Celulares de Cáncer (Barretina JS, Caponigro G, Stransky N (2012) Nature; 483:603-7), se reunió el número de copias del gen, la expresión de ARNm y los datos de mutación en una sola matriz. La actividad celular de un único agente de diversos antagonistas de IAP se evaluó contra un panel de > 500 líneas de células tumorales usando un ensayo de proliferación de 72 horas. Se clasificaron estas líneas celulares en clases sensibles, intermedias y refractarias con base de la distribución de los datos de C150 y curación manual de las respuestas individuales. Una prueba estadística se aplicó con el fin de identificar "características" genómicas que podrían diferenciar las líneas celulares sensibles a antagonistas de IAP de líneas refractarias. Entre los genes mejor clasificados que muestran la expresión de ARNm diferencial estuvieron TNF y RIPK1, dos genes con evidencia de la respuesta apoptótica a los antagonistas de IAP con base en estudios experimentales que implican una o unas pocas líneas celulares. Por lo tanto, se pueden extender las observaciones anteriores sobre experimentos limitados sistemáticamente a un gran conjunto de datos y se identificó un conjunto adicional de siete genes (CXLC10, CCL5, NFKBIA, HERC5, CDYL, STK39 y MAPK14), cuyos ARNm se expresaron diferencialmente en líneas refractarias comparadas sensibles.

Se construyó un modelo de aprendizaje automático predictivo usando el clasificador de Naive Bayes con base en la firma de 9 genes, así como una firma de 2-genes TNF/RIPK1. Estos modelos predictivos aumentan significativamente la tasa de respuesta de la línea celular a los antagonistas de IAP como se ilustra por el desempeño predictivo (área bajo la curva ROC o AUC) en la Tabla 2. En algunos regímenes de modelo de corte, esto se traduce en un aumento de dos a tres veces en la tasa de respuesta a (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, uno de los antagonistas de IAP en nuestra serie, en comparación con las líneas celulares aleatorias "de múltiple procedencia" donde no se aplica ninguna selección. Por ejemplo, en el modelo optimizado de cortes para obtener un rendimiento equilibrado entre la sensibilidad y la especificidad de cada modelo, las firmas produjeron tasas de respuesta del 16-18% en la validación cruzada en comparación con la tasa de respuesta del 8% al azar sin ningún tipo de selección. Esta tasa de respuesta mejorada fue validada adicionalmente en la prueba experimental independiente del conjunto de compuestos sin tratamiento de líneas celulares que se predijo serían sensibles (las AUC se muestran en la tabla 2).

Tabla 2

Modelo	Desempeño de AUC (Área bajo la curva ROC)	Contexto del conjunto de muestras
gen 2	0,81	Validación cruzada dentro de líneas celulares
gen 3	0,79	
gen 9	0,75	
gen 2	0,61	Conjunto nuevo de prueba independiente para la línea celular
gen 3	0,60	
gen 9	0,76	

30

Adicionalmente, la (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida ha sido probado para determinar su actividad de agente único en modelos de tumores derivados de 55 pacientes que representan cáncer de mama triple negativo, NSCLC y modelos de

cáncer pancreático Se observaron una serie de respuestas que van desde la regresión del tumor a ningún efecto. Se observó que las firmas de 2-genes, 3-genes y 9 genes pueden enriquecer la respuesta a una tasa consistente con los datos de líneas celulares (Tabla 3, proporcionando así una validación in vivo independiente para la firma. Por ejemplo, en el modelo optimizado de cortes para obtener un rendimiento equilibrado entre la sensibilidad y la especificidad, las firmas produjeron tasas de respuesta de ~ 30% en comparación con la tasa de respuesta del 11% al azar. Entre los siete genes candidatos nuevos anteriores, se encontró que los niveles más bajos de STK39 muestran una fuerte correlación con la respuesta in vivo de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (Figura 1). Los resultados del estudio de xenoinjerto mostraron que TNF, RIPK1 y STK39 (firma de "3-genes") se desempeñaron sorprendentemente bien en la predicción de la respuesta in vivo de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (Tabla 3).

Tabla 3

Modelo	Desempeño de AUC (Área bajo la curva ROC)	Contexto de conjunto de muestras
gen 2	0,86	Conjunto de prueba independiente de xenoinjerto
gen 3	0,93	
gen 9	0,87	

También se mostró que este conjunto de tres ARNm predice la respuesta a otro antagonista de IAP.

El método para la cuantificación de ARNm de TNF, RIPK1, y STK39 por RT-PCR en xenoinjertos de tumores humanos primarios (Figuras 1-3) se realizó como sigue. Se extrajo ARN de tumores humanos primarios cultivados en ratones utilizando el "Mini Kit RNeasy" de Qiagen (número de catálogo 74106). ADNc fue sintetizado utilizando el "kit de transcripción reversa de alta capacidad de ADNc" de Applied Biosystems (número de pieza 4368813). El ADNc fue pre-amplificado utilizando el kit "Taqman Preamp Master Mix (2X)" de Applied Biosystems (número de parte 4384266) utilizando 50 ng de ADNc y preamplificación durante 14 ciclos. PCR Taqman en tiempo real se realizó en formato de placas de 384 pozos con 5 microlitros de ADNc preamplificado utilizando ensayos de Applied Biosystems: Ensayo de TNF ID Hs99999043_m1; ensayo de RIPK1 ID Hs00355392_m1; ensayo de STK39 ID Hs00202989_m1. Los resultados de PCR en tiempo real se normalizaron a 3 genes de control: Ensayo de B2M ID Hs99999907_m1; ensayo de HUWE1 ID Hs00948075_m1; ensayo de UBC ID Hs00824723_m1.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de análisis de una muestra biológica de un sujeto con cáncer, que comprende determinar un nivel de expresión de ARNm de biomarcadores que comprenden TNF y RIPK1 y STK39 en la muestra biológica tomada del sujeto, en donde el nivel de expresión de los biomarcadores en comparación con un control provee un indicador de si el sujeto tiene una mayor probabilidad de respuesta a un inhibidor del inhibidor de la Proteína de Apoptosis (IAP).
- 10 2. Un método de selección de un sujeto que tiene cáncer para el tratamiento con la (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, comprendiendo el método determinar un nivel de expresión de ARNm de biomarcadores que comprenden TNF, RIPK1 y STK39 en la muestra biológica tomada del sujeto, para predecir así una mayor probabilidad de respuesta a la (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.
- 15 3. Un inhibidor del inhibidor de Proteína de la Apoptosis (IAP) (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer caracterizado por el nivel de expresión de ARNm de los biomarcadores que comprenden TNF, RIPK1 y STK39 en la muestra biológica tomada del sujeto.
4. Un inhibidor del inhibidor de Proteína de la Apoptosis (IAP) para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer caracterizado por el nivel de expresión de ARNm de los biomarcadores que comprenden TNF, RIP1 y STK39.
- 20 5. El inhibidor de IAP para uso según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el sujeto tiene un mayor nivel de expresión de ARNm de TNF y RIPK1 y una disminución del nivel de expresión de STK39.
6. El método de las reivindicaciones 1 o 2 o inhibidor de IAP para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 - 5 en donde el cáncer es cáncer de mama, de ovario o de pulmón.
7. El método o inhibidor de IAP para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes anteriores en donde el nivel de expresión se determina usando RT-PCR.
- 25 8. El método de la reivindicación 1 en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 9. El inhibidor de IAP para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el inhibidor de IAP es (S)-N-((S)-1-Ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

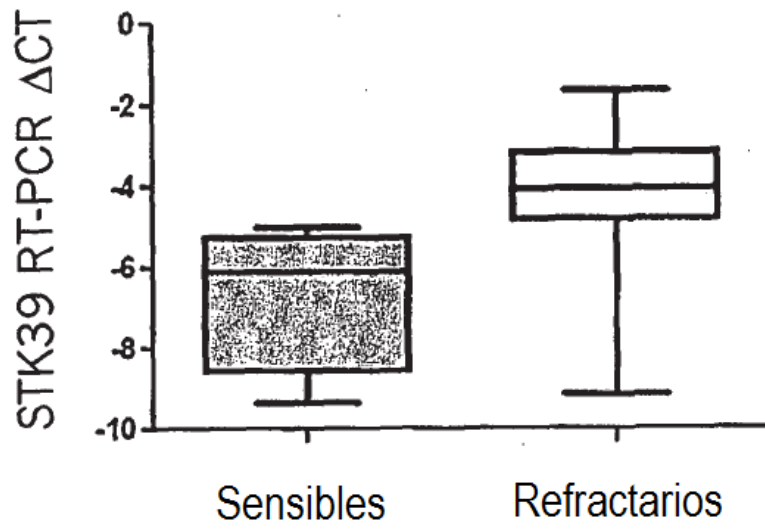


Fig. 1

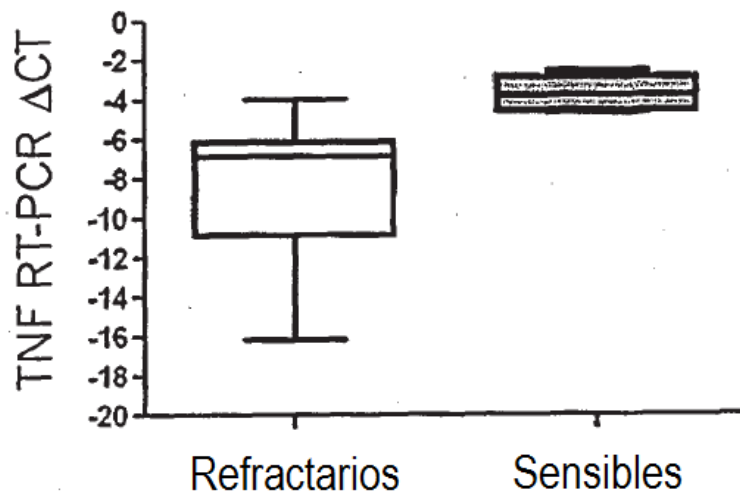


Fig. 2

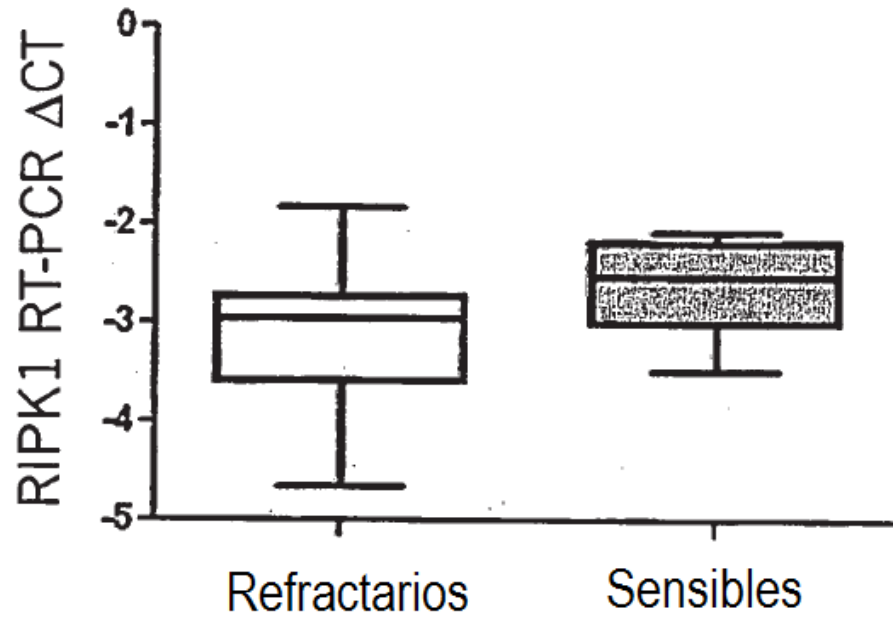


Fig. 3