

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 618**

51 Int. Cl.:

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/501 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014 PCT/IB2014/059585**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14141038**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 14712783 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2972372**

54 Título: **Marcadores asociados con inhibidores de WNT**

30 Prioridad:

11.03.2013 US 201361776334 P

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

14.09.2018

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

CHE, JIANWEI;

HARRIS, JENNIFER;

HSIEH, HSIN-I;

LI, JIE;

LIU, JUN y

NG, NICHOLAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 681 618 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

Marcadores asociados con inhibidores de WNT

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la farmacogenómica y al uso del biomarcador Notch 1 para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de Wnt así como usos médicos de inhibidores de Wnt que implican la determinación de la expresión de Notch 1. La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes

10 La señalización de Wnt es una de las vías oncogénicas clave en múltiples cánceres^{1,2}. Tras la unión a sus receptores, la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína 5/6 de baja densidad (LRP5/6) y Frizzled (FZD) (ambos son receptores transmembrana de paso único requeridos para la señalización de Wnt) en la membrana plasmática, el ligando Wnt provoca la interrupción de la maquinaria de degradación de β -catenina compuesta de Axina2, GSK3 β , APC y otras proteínas, lo que conduce a la acumulación de β -catenina en el citoplasma³. Los niveles elevados de β -catenina conducen en última instancia a su translocación en el núcleo para formar un complejo con LEF/TCF, y
15 promover corriente abajo la expresión de genes³.

La desregulación de la señalización de Wnt¹ puede ocurrir a través de mutaciones de los componentes aguas abajo, tales como APC y β -catenina que están bien documentadas en cáncer de colon¹. Además, la sobreexpresión de ligandos Wnt o co-estimulantes, como RSP02/3, o el silenciamiento de genes inhibidores de Wnt se han reportado en diversos tipos de cáncer^{1,4}. Además, las mutaciones de componentes de la ruta pan-Wnt, tales como Axina1/2 o los
20 co-receptores de RSPO RNF43/ZNFR3, desempeñan un papel potencial clave en carcinoma de páncreas, colon y hepatocelular⁴⁻⁶. Tanto las mutaciones puntuales como las mutaciones críticas de la vía Wnt en modelos animales han demostrado la función de señalización oncogénica de esta vía^{7,8}. Además de la vía Wnt canónica, hay pruebas emergentes de que la señalización no canónica de Wnt, a través de FZD y VANGL, es crítica para diversos aspectos de la tumorigénesis, incluyendo la migración celular y la metástasis tumoral⁹.

25 Ambas actividades de señalización canónica y no canónica de Wnt son dependientes de ligando Wnt. Durante la biosíntesis de ligandos Wnt, Wnt se somete a acilación pos-traduccion que está mediada por Porcupine (PORCN), una O-aciltransferasa unida a membrana^{3,10}. PORCN es específico y se dedica a la acilación post-traduccion de Wnt, que se requiere para la posterior secreción de Wnt¹¹. La pérdida de PORCN conlleva a la inhibición del ligando de Wnt induciendo la actividad de señalización en modelos de ratones silenciados^{12,13}. En humanos, la pérdida de mutación
30 de la función (LoF) del gen PORCN provoca hipoplasia dérmica focal en un trastorno dominante ligado a X asociado con una variedad de anomalías congénitas en ambos heterocigotos y aquellos con mosaicismo para el gen PORCN. Este fenotipo es consistente con el papel de la vía de señalización de Wnt durante la embriogénesis y el desarrollo^{4,15}. Liu et al., 2011, divulgan el uso de un inhibidor de puercoespín disponible por vía oral que dio como resultado la regresión tumoral en un modelo murino de cáncer de mama.

35 Resumen de la invención

La divulgación se refiere al análisis que Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3, WNT7A, y/o
40 DTX3L actúan como biomarcadores específicos en la determinación de la sensibilidad de las células a los inhibidores de Wnt. La divulgación se refiere al análisis de que al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1 proporciona una "firma génica" para un inhibidor de Wnt que tiene precisión y especificidad aumentadas en la predicción de cuales células de cáncer o cánceres son sensibles a un inhibidor de Wnt. El método analiza la expresión, expresión génica, estado de la mutación, nivel de proteína o una función de al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1 en una muestra de cáncer tomada de un paciente y comparada con un control predice la sensibilidad de la muestra de cáncer a un inhibidor de Wnt. El patrón de cambios en el nivel de expresión puede ser
45 indicativo de una respuesta favorable o desfavorable. Además, la firma génica seleccionada de la Tabla 1 tiene un valor predictivo incrementado, ya que también indica que la vía de Wnt es funcional. La descripción proporciona también un ejemplo de "medicina personalizada", en donde los pacientes son tratados en base a una firma genómica funcional que es específica a ese individuo.

50 El valor predictivo de al menos un biomarcador divulgado en la presente también se puede utilizar después del tratamiento con un inhibidor de Wnt para determinar si el paciente sigue siendo sensible al tratamiento. Una vez que el inhibidor de Wnt ha sido administrado, los biomarcadores se utilizan para supervisar la continua sensibilidad del paciente al tratamiento con un inhibidor de Wnt. La divulgación también se refiere al aumento o disminución de la expresión de los genes identificados antes y después del tratamiento con un inhibidor de Wnt. Esto es útil para determinar cuáles pacientes reciben el curso correcto de tratamiento. La invención comprende un método de predicción y control de la sensibilidad de un paciente al tratamiento con un inhibidor de Wnt. El método incluye la etapa
55 de administración de un inhibidor de Wnt al paciente y la medición de la expresión génica de biomarcadores en una muestra biológica obtenida del paciente. La respuesta del paciente se evalúa con base en la detección de la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1. La detección y/o alteración en el nivel de expresión

de al menos un biomarcador en comparación con un control es indicativo de la sensibilidad del paciente al tratamiento. El patrón de cambios en el nivel de expresión puede ser indicativo de una respuesta del paciente favorable o una desfavorable.

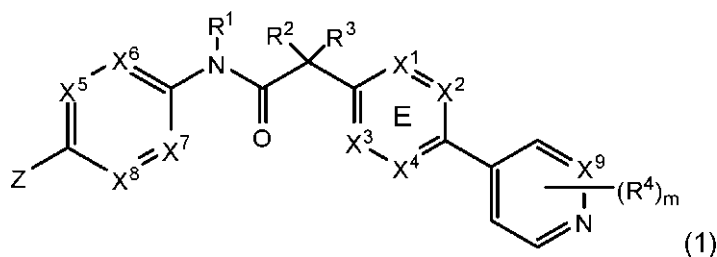
5 La divulgación también proporciona inhibidores de Wnt para su uso en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello. Se prevé una respuesta terapéutica particularmente buena en los pacientes que tienen en su muestra de cáncer expresión diferencialmente disminuida de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 en comparación con un control.

Los aspectos y características de la presente divulgación se resumen en los siguientes ítems y se pueden utilizar respectivamente solos o en combinación:

- 10 1. Un método de predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para tratamiento con un inhibidor de Wnt, comprendiendo el método:
- a) proporcionar una muestra de cáncer de un paciente con cáncer
 - b) medir la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1, en la muestra de cáncer obtenida del paciente; y
- 15 c) comparar la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador con la expresión génica de dicho biomarcador en una muestra de control,
- d) correlacionar el aumento o disminución en la comparación de la expresión génica con la sensibilidad del paciente al tratamiento con el inhibidor de Wnt.
2. Un método de tratamiento de un paciente con cáncer con un inhibidor de Wnt, que comprende:
- 20 a) proporcionar una muestra de cáncer de un paciente con cáncer
- b) medir la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1, en la muestra de cáncer obtenida del paciente;
 - c) comparar la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador con la expresión génica del biomarcador en una muestra control,
- 25 d) determinar la sensibilidad del paciente al inhibidor de Wnt; y
- e) administrar una cantidad efectiva del inhibidor de Wnt a un paciente que se ha determinado es sensible al inhibidor de Wnt.
- 30 3. Un método de predecir la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de Wnt, comprendiendo el método: a) medir la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 en la célula; b) comparar la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 con la expresión génica de una célula normal o de control;
- c) predecir la sensibilidad de la célula cancerosa al inhibidor de Wnt a partir de la comparación de la expresión génica diferencial.
4. Un método de determinar la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de Wnt, comprendiendo el método:
- 35 a) poner en contacto una célula de cáncer con al menos un inhibidor de Wnt;
- b) medir la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1, en la célula puesta en contacto con el inhibidor de Wnt;
 - c) comparar la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador con la expresión génica del biomarcador a partir de una célula de control no tratada o tratada con placebo;
- 40 d) correlacionar el aumento o disminución en la expresión de al menos un biomarcador cuando se compara con la expresión de al menos un biomarcador a partir de la célula de control no tratada o tratada con placebo a la sensibilidad de la célula cancerosa a un inhibidor de Wnt.
5. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 4, en donde más de un biomarcador se selecciona de la Tabla 1.
6. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 5, en donde el biomarcador es Notch 1.
- 45 7. El método del ítem 6, en el que Notch1 tiene mutación en el dominio extracelular.
8. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 7, en donde la comparación de la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador con la expresión génica de una muestra de control indica una vía de Wnt funcional.

9. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 8, en donde el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
- 5 10. El método del ítem 2 o 4, en donde el cáncer se trata con un inhibidor de Wnt y muestra la expresión diferencial de Axin2, LEF1 y/o NKD1 en comparación con la expresión en una muestra de cáncer que es sensible a un inhibidor de Wnt.
11. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 10, en el que el CI50 de la célula cancerosa puesta en contacto con al menos un inhibidor de Wnt es de menos de 1 uM, preferiblemente menos de 0.5 uM, más preferiblemente menos de 0.2 uM.
- 10 12. El método del ítem 11, donde la célula se pone en contacto con el inhibidor de Wnt al menos en dos puntos de tiempo diferentes.
13. El método de uno cualquiera de los ítems 4, 11 o 12, donde la célula se pone en contacto mediante dos inhibidores diferentes de Wnt en la etapa a) de forma simultánea o secuencial.
- 15 14. El método de uno cualquiera de los ítems 4, o 11 a 13, en el que las etapas b) y c) se repiten en puntos de tiempo seleccionado del grupo que consta de: 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana, 1 mes y varios meses después de la administración de cada dosis del inhibidor de Wnt.
- 15 15. Un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente, en donde el paciente se selecciona sobre la base de:
- a) medir la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1, en la muestra de cáncer obtenida del paciente;
- 20 b) comparar la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador con la expresión génica del biomarcador en una muestra de control;
- c) determinar la sensibilidad del paciente al inhibidor de Wnt; y
- d) seleccionar el paciente que es sensible al inhibidor de Wnt.
- 25 16. Un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que tiene una expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 en comparación con una expresión génica de control, en donde la expresión génica diferencial se correlaciona con que el paciente que es sensible al inhibidor de Wnt.
17. El inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con los ítems 15 o 16, en donde más de un biomarcador se selecciona de la Tabla 1.
- 30 18. El inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 15 a 17, en donde el biomarcador es Notch1.
19. El inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 15 a 18, en el que el Notch1 tiene la mutación en el dominio extracelular.
- 35 20. El inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 15 a 19, en donde el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, preferiblemente la muestra de cáncer después del tratamiento con un inhibidor de Wnt está mostrando expresión de AXIN2, LEF1 y/o NKD1 de una muestra de cáncer que es sensible a un inhibidor de Wnt.
- 40 21. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el paciente se selecciona en base a mostrar una expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 en una muestra de células de cáncer obtenida de dicho paciente en comparación con una muestra de células de control normal, en el que la expresión génica diferencial se correlaciona con el paciente que es sensible al inhibidor de Wnt.
- 45 22. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que muestra una expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 en comparación con una expresión génica de control, en donde la expresión génica diferencial se correlaciona con el paciente que es sensible al inhibidor de Wnt.
23. La composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con los ítems 21 o 22, en donde más de un biomarcador se selecciona de la Tabla 1.
- 50 24. La composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 21 a 23, en donde el biomarcador es Notch1.

25. La composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 21 a 24, en donde el Notch1 tiene una mutación en el dominio extracelular.
26. La composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 21 a 25, en el que el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
27. Un kit para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para tratamiento con un inhibidor de Wnt que comprende:
- medios para detectar la expresión de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1; y
 - instrucciones sobre cómo utilizar dicho kit.
28. Uso del kit según el ítem 27 para cualquiera de los métodos de los ítems 1 a 14.
29. Un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
30. Un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de carcinoma de células escamosa de cabeza y cuello según el ítem 29, en donde el inhibidor de Wnt se administra a un paciente con un cáncer que muestra una expresión génica diferencial de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 en comparación con una expresión génica de control, en donde la expresión génica diferencial se correlaciona con el paciente que es sensible al inhibidor de Wnt.
31. El inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello de acuerdo con el ítem 30, en el que el biomarcador es Notch1.
32. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 14, el inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 15 a 20, la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los ítems 21 a 26, o un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según el ítem 29 o 30, en donde el inhibidor de Wnt se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva.
33. El inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente de acuerdo con cualquiera de los ítems 15 a 20, en donde una cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor de Wnt es administrada al paciente.
34. El inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente según el ítem 33, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor de Wnt se administra selectivamente al paciente que se determina como sensible al inhibidor de Wnt, o que administra selectivamente una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco diferente del inhibidor de Wnt al paciente con base en que el paciente no es sensible al inhibidor de Wnt.
35. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 14, el inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 15 a 20, 33 o 34, la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los ítems 21 a 26, el kit según el ítem 27 o un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello de acuerdo con cualquiera de los ítems 29 a 32, en donde el inhibidor de Wnt es un compuesto de la Formula (1):



- o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, en donde:
- en donde $\text{X}^1, \text{X}^2, \text{X}^3$ y X^4 son seleccionados a partir de N y CR^7 ;
- uno de $\text{X}^5, \text{X}^6, \text{X}^7$ y X^8 es N y los otros son CH;
- X^9 se selecciona a partir de N y CH;
- Z se selecciona a partir de fenilo, pirazinilo, piridinilo, piridazinilo y piperazinilo; en el que cada fenilo, pirazinilo, piridinilo, piridazinilo o piperazinilo de Z está opcionalmente sustituido con un grupo R^6 ; R^1, R^2 y R^3 son hidrógeno;
- m es 1;
- R^4 se selecciona a partir de hidrógeno, halo, difluorometilo, trifluorometilo y metilo;

R⁶ se selecciona de hidrógeno, halo y -C(O)R¹⁰; en el que R¹⁰ es metilo; y

R⁷ se selecciona a partir de hidrógeno, halo, ciano, metilo y trifluorometilo.

36. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 14, el inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 15 a 20, 33 o 34, la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los ítems 21 a 26, el kit de acuerdo al ítem 27 o un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según cualquiera de los ítems 29 a 32, en el que el inhibidor de Wnt es un compuesto seleccionado del grupo de N-[5-(3- fluorofenil)piridin-2-il]-2-[5-metil-6-(piridazin-4-il)piridin-3-il]acetamida;
- 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida;
- N-(2,3'-bipiridin-6'-il)-2-(2',3-dimetil-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida;
- 10 N-(5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-2-(2'-metil-3-(trifluorometil)-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida;
- N-(5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-2-(2'-fluoro-3-metil-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida; y
- 2-(2'-fluoro-3-metil-2,4'-bipiridin-5-il)-N-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida;
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 15 37. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 14, el inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de los ítems 15 a 20, 33 o 34, la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los ítems 21 a 26, el kit de acuerdo al ítem 27 o un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según cualquiera de los ítems 29 a 32, en el que el inhibidor de Wnt es 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida.
- 20 38. Uno cualquiera de los ítems 1 a 37, en donde la expresión o expresión génica es la expresión de ADN, número de copia de ADN, expresión de ARNm, expresión de ADNc, transcripción de proteínas, expresión de proteínas, modificación del ADN, modificación del ADNc, modificación del mRNA, modificación de proteínas, función del ADN, función del ADNc, función del ARNm, función de proteínas, mutación del ADN, mutación del ADNc, mutación del ARNm, mutación de proteínas, o combinaciones de los mismos; preferiblemente es mutación del ADN.
- 25 39. Uno cualquiera de los ítems 1 a 38 en donde el biomarcador es seleccionado del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, OR7G3, WNT11, WNT 10A, WNT3, WNT7A, y DTX3L.
40. Uno cualquiera de los ítems 1 a 38 en donde el biomarcador es seleccionado del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT 10A, WNT3, WNT7A, y DTX3L.
- 30 41. Uno cualquiera de los ítems 1 a 38, en donde el biomarcador se selecciona del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, SFRP2, FRZB, SFRP4 y DKK2.
42. Uno cualquiera de los ítems 1 a 38, en donde el biomarcador se selecciona del grupo de Notch1, Notch2 y Notch3.
43. Uno cualquiera de los ítems 1 a 38, en donde el biomarcador es Notch1.
- 35 44. Uno cualquiera de los ítems 1 a 38 en donde el biomarcador es seleccionado del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT 10A, WNT3 y WNT7A.
45. Uno cualquiera de los ítems 1 a 38, en donde el biomarcador es HRAS o FAT1.
- 40 46. Uno cualquiera de los ítems 1 a 38, en donde el biomarcador se selecciona del grupo que consta de FAM58A, FLJ43860, NOTCH1, OR7G3, CCDC168, ZNF527 y CDKN2A.
47. La realización de uno cualquiera de los ítems 1 a 38, en donde el biomarcador se selecciona del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT 10A, WNT3, WNT7A, y DTX3L, preferiblemente del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3 y DTX3L.
- 45 48. El uso de un compuesto seleccionado de la tabla 1 como un biomarcador.
49. El uso de un compuesto seleccionado del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, OR7G3, wnt11, WNT 10A, Wnt3, WNT7A, y DTX3L, como un biomarcador.

50. El uso de un compuesto seleccionado del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, SFRP2, FRZB, SFRP4 y DKK2, como un biomarcador.
51. El uso de un compuesto seleccionado del grupo de Notch1, Notch2 y Notch3 como un biomarcador.
52. El uso de un compuesto Notch1 como un biomarcador.
- 5 53. El uso de un compuesto seleccionado del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT1 OA, WNT3 y WNT7A, como un biomarcador.
54. El uso de un compuesto seleccionado del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT1, WNT 10A, WNT3, WNT7A, y DTX3L, como un biomarcador.
- 10 55. El uso de un compuesto HRAS o FAT1 como un biomarcador.
56. El uso de un compuesto seleccionado del grupo que consta de FAM58A, FLJ43860, NOTCH1, OR7G3, CCDC168, ZNF527 y CDKN2A como un biomarcador.
57. El uso de un compuesto seleccionado del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT 10A, WNT3, WNT7A, y DTX3L, preferiblemente del grupo de Notch1, Notch2, Notch3, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3 y DTX3L, como un biomarcador.
- 15 58. El uso de un compuesto según cualquiera de los ítems 46 a 57, en donde el uso indica la sensibilidad de un paciente de cáncer para el tratamiento con un inhibidor de Wnt.
59. Uno cualquiera de los ítems 39 a 42, 44 a 51, o 53 a 58, en el que al menos dos biomarcadores, al menos tres o al menos cuatro biomarcadores, se utilizan para indicar juntos sensibilidad de un paciente de cáncer para el tratamiento con un inhibidor de Wnt.
- 20 60. Uno cualquiera de los ítems 1 a 59, en donde
- 25 - la expresión de WNT11, WNT1 OA, WNT3 o WNT7A en una muestra del paciente es mayor en comparación con un control, dicha expresión indica la sensibilidad del paciente para el tratamiento con un inhibidor de Wnt;
- la expresión de AXIN2, LEF1 o NKD1 en una muestra del paciente disminuye después del tratamiento en comparación con un pretratamiento un control, dicha expresión indica la sensibilidad del paciente al tratamiento con un inhibidor de Wnt;
- 30 - la expresión de Notch1, Notch2 o Notch3 se reduce, en particular la actividad o función se disminuye o aumenta en una muestra del paciente en comparación con un control, dicha expresión, en particular disminución de la actividad o función, indica la sensibilidad del paciente para el tratamiento con un inhibidor de Wnt;
- la expresión de SFRP2, FRZB, SFRP4 o DKK2 en una muestra del paciente es menor en comparación con un control, dicha expresión indica la sensibilidad del paciente para el tratamiento con un inhibidor de Wnt;
- 35 - la expresión de FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, FAT1, OR7G3 o DTX3L es más baja, en particular la pérdida de función es más alta, en una muestra del paciente en comparación con un control, dicha expresión, en particular la pérdida de la función, indica sensibilidad del paciente para el tratamiento con un inhibidor de Wnt;
- la expresión de HRAS es mayor, particularmente aumenta en función, en una muestra de paciente en comparación con un control, indica la sensibilidad del paciente para el tratamiento con un inhibidor de Wnt;
- 40 61. El ítem 60, en donde el inhibidor de Wnt es como se define en cualquiera de los ítems 35 a 37.

Descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la estructura del COMPUESTO A. La Figura 1B muestra la estructura del COMPUESTO B.

- La Figura 2A muestra la unión del compuesto B radiomarcado con ³H a PORCN. La interacción específica entre el COMPUESTO B y PORCN puede ser contrarrestada por el COMPUESTO B no etiquetado (Figura 2A). La Figura 2B muestra la unión del COMPUESTO A a PORCN.
- 45

La Figura 3A muestra la inhibición potente del COMPUESTO A de la señalización de Wnt en el ensayo de co-cultivo de Wnt con una IC50 de 0.4 nM. La Figura 3B muestra que el efecto inhibitor fue rescatado por la adición de medio acondicionado de Wnt3A exógeno.

La Figura 4 muestra el efecto de diversas dosis del COMPUESTO A sobre células 293A que fueron transfectadas con HA-Wnt3A. Como se muestra en la Figura 4, el COMPUESTO A potentemente atenuó la abundancia de HA-Wnt3A en el sobrenadante mientras se dispersa el lisado HA-Wnt3A, lo que sugiere que la secreción de Wnt3A fue inhibida sustancialmente por el COMPUESTO A de una manera dependiente de la dosis.

5 La Figura 5A demuestra que el COMPUESTO A de hecho bloqueó fuertemente la fosforilación dependiente de Wnt de LRP6 en las células L-Wnt3A autocrinas, una línea celular mamaria de ratón que sobreexpresa Wnt3A. La Figura 5B muestra que los residuos alrededor del sitio de palmitoilación de Wnt putativo, Ser209, se conservan entre todos los 19 Wnts. La Figura 5C muestra que el COMPUESTO A demostró actividades inhibitoras comparables contra todos los Wnts probados, incluyendo Wnt1, 2, 3, 3A, 6, 7A y 9A.

10 Figura 6. Una respuesta de diversas líneas celulares por el tipo de cáncer para el tratamiento con el COMPUESTO A. Una línea celular sensible se define como que logra más de 50% de reducción de ARNm AXIN2 después del tratamiento con 10-100 nM del COMPUESTO A durante 48 horas. Como se muestra en la Figura 6, las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello (HNSCC) se encuentran entre los principales tipos de cáncer que fueron sensibles al COMPUESTO A.

15 La Figura 7 muestra que entre las líneas celulares HNSCC, 31 de 96 mostraron una inhibición de la vía de Wnt frente al tratamiento con el COMPUESTO A.

La Figura 8A muestra que el COMPUESTO A inhibe potentemente la producción de AXIN2 dependiente de Wnt con una CI50 de 0.3 nM. La Figura 8B muestra que el COMPUESTO A atenúa fuertemente la formación de colonias HN30 aunque con un CI50 desplazado a la derecha.

20 La Figura 9A muestra que el efecto de formación de colonias reducidas del COMPUESTO A puede ser parcialmente rescatado con la sobreexpresión de β -catenina dominante. La Figura 9B confirma que el efecto celular del COMPUESTO A fue consistente con la inhibición de las actividades de la señalización de Wnt dependientes de PORCN; shRNA contra PORCN inhibe sustancialmente la expresión del gen diana de Wnt AXIN2. La Figura 9C muestra que shRNA contra PORCN también inhibió la formación de colonias de células HN30 in vitro.

25 La Figura 10 muestra la actividad anti-tumoral in vivo del COMPUESTO A; es decir, en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de ratón de HNSCC HN30. Cuando se dosifica una vez al día el COMPUESTO A indujo eficacia dependiente de dosis y redujo el peso tumoral (Figura 10A). Después de una sola dosis de COMPUESTO A a 3 mg/kg, los niveles de expresión de ARNm de AXIN2 en los tumores se redujeron a ~60-95% entre 5 y 10 horas después de la dosis (Figura 10B). Adicionalmente, como se muestra en la Figura 10C, los niveles de pLRP6 en los tumores de HN30 se redujeron sustancialmente de una manera dependiente del tiempo.

30 Figura 11 Los principales oncogenes o genes supresores de tumores mutados en el conjunto de líneas celulares HNSCC.

Figura 12 Los principales genes candidatos cuya pérdida agregada de mutaciones funcionales se correlaciona mejor con los datos de respuesta PD del COMPUESTO A de las líneas celulares HNSCC.

35 La Figura 13A y la Figura 13B muestran la mutación de pérdida de la función (LoF) de Notch1 altamente enriquecido en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello sensibles al COMPUESTO A. A) Diagramas de posibles mutaciones LoF de Notch1 en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. N: N-terminal; C: C-terminal; LNR: Repetición Lin12-Notch; TMD: Dominio de transmembrana; PEST: Prolina, ácido glutámico, serina, dominio (PEST) rico en treonina. Los cambios de marco (fs) y mutaciones sin sentido (X) incluyen E488fs, A495fs, K538fs, G192X, P460fs, E216X, se destacan en rojo. B) La lista del desplazamiento del marco de Notch1 y las mutaciones sin sentido en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. C) Notch1 C478F mostró una reducción completa de las actividades en comparación con la de tipo salvaje, en un ensayo de gen reportero Notch1 con o sin estimulación de DLL1.

40 La Figura 14 muestra eficacia in vivo del COMPUESTO A. En un modelo de xenoinjerto SNU1076 en ratones, el COMPUESTO A a la dosis de 5 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento del tumor (T/C: 25%) después de 14 días de tratamiento (Figura 14A). El COMPUESTO A inhibió sustancialmente la vía de Wnt, como se indica por la reducción de 70% de AXIN2 (Figura 14B).

45 La Figura 15 muestra las mutaciones FAT1 en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. Las mutaciones FAT1 se enriquecen en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello sensibles al COMPUESTO A.

50 La Figura 16 muestra las mutaciones HRAS en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. Las mutaciones HRAS se enriquecen en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello sensibles al COMPUESTO A.

Descripción de la invención

Definiciones

Como se utiliza en la especificación y las reivindicaciones, la forma singular "uno", "una" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido claramente dicte lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de las mismas.

5 Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo los rangos, son aproximaciones que son variadas (+) o (-) en incrementos de 0.1. Se debe entender, aunque no siempre se declara explícitamente que todas las designaciones numéricas son precedidas por el término "aproximadamente". También se ha de entender, aunque no siempre se declara explícitamente, que los reactivos descritos en la presente son meramente de ejemplo y que los equivalentes de tales se conocen en la técnica.

10 Los términos "marcador" o "biomarcador" se usan indistintamente en el presente documento. Un biomarcador es un ácido nucleico o polipéptido y la presencia, ausencia o expresión diferencial del ácido nucleico o polipéptido, el parámetro que describe el número de genes, mutación de genes o proteínas, función o actividad y se utiliza para determinar la sensibilidad a cualquier inhibidor de Wnt. Por ejemplo, Notch1 es un biomarcador y la expresión de ARNm de Notch1 en una célula de muestra de cáncer se reduce cuando se compara con la expresión de Notch1 en tejido normal (no canceroso) o tejidos de control.

15 "PORCN" se refiere a Porcupine, una aciltransferasa unida a membrana, necesaria para la modificación de Wnt post-traducción. A menos que se especifique lo contrario, PORCN como se usa en la presente, se refiere a números de acceso PORCN humanos NM_017617.3/NP_060087 (4851/P46531.4).

20 "Notch1" se refiere al homólogo Notch 1. Es un receptor de membrana de paso único en la señalización de Notch. A menos que se especifique lo contrario, Notch1 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso Notch1 humanos NM_017617.3/NP_060087/GI:148833508 (4851/P46531.4). "Notch2" se refiere al locus neurogénico de la proteína homóloga 2, un receptor de membrana de paso único en la señalización de Notch. A menos que se especifique lo contrario, Notch2 como se utiliza en la presente, se refiere a números de acceso Notch2 humanos NM_024408.3/NP_077719/GI: 24041035 (4853/Q04721.3). "Notch2" se refiere al locus neurogénico de la proteína homóloga 3, un receptor de membrana de paso único en la señalización de Notch. A menos que se especifique lo contrario, Notch3 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso Notch3 humanos NM_000435.2/NP_000426/GI: 134 244 285 (4854/Q9UM47.2).

30 "AXIN2" se refiere a la proteína 2 de inhibición del eje. Es una proteína citosólica con un papel importante en la regulación de la estabilidad de la beta-catenina. A menos que específicamente se indique lo contrario, AXIN2 como se usa en la presente, se refiere a los números de acceso AXIN2 humanos NM_004655.3/NP_004646/GI: 195 927 059 (8313/Q9Y2T1)

"LEF1" se refiere al factor 1 linfocitario potenciador de la unión. Es una proteína nuclear que forma un complejo con β -catenina y conlleva a la expresión del gen objetivo corriente abajo. A menos que específicamente se indique lo contrario, LEF1 como se usa en la presente, se refiere a los números de acceso LEF1 humanos NM_016269/NP_001124185/GI: 7705917 (51176/Q9UJU2.1)

35 "NKD1" se refiere a cutícula 1 desnuda. Es una proteína citosólica que interactúan con Dishevelled. A menos que específicamente se indique lo contrario, NKD1 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso NKD1 humanos NM_033119/NPJ49110/GI: 14916433 (85407/Q969G9.1)

40 "SFRP2" se refiere a proteína 2 secretada relacionada con frizzled. Es un modulador soluble de señalización de Wnt. A menos que específicamente se indique lo contrario, SFRP2 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso SFRP2 humanos NM_003013.2/NP_003004/GI: 48475052 (6423/Q96HF1.2)

"FRZB" se refiere a la proteína relacionada con frizzled, también un modulador soluble de la señalización de Wnt. A menos que específicamente se indique lo contrario, FRZB como se utiliza en la presente, se refiere a números de acceso FRZB humanos NM_001463.3/NP_001454/GI:38455388 (2487/Q92765.2)

45 "SFRP4" se refiere a proteína 4 secretada relacionada con frizzled, también un modulador soluble de señalización de Wnt. A menos que específicamente se indique lo contrario, SFRP4 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso SFRP4 humanos NM_003014.3/NP_003005/GI:170784838 (6424/Q6FHJ7.2)

"DKK2" se refiere a la proteína 2 relacionada con dickkopf, también un modulador soluble de señalización de Wnt. A menos que específicamente se indique lo contrario, DKK2 como se utiliza en la presente, se refiere a números de acceso DKK2 humanos NM_014421.2/NP_055236/GI:7657023 (27123/Q9UBU2.1)

50 "WNT11" se refiere a WNT 11. Es una proteína de ligando Wnt secretada. A menos que específicamente se indique lo contrario, WNT11 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso WNT11 humanos NM_004626.2/NP_004617/GI: 17017974 (7481/096014)

55 "WNT 10A" se refiere a WNT 10A, también una proteína de ligando Wnt secretada. A menos que específicamente se indique lo contrario, WNT10A como se usa en la presente, se refiere a números de acceso-OA WNT10A humanos NM_025216.2/NP_079492/GI:16936520 (80326/Q9GZT5).

"WNT3" se refiere a WNT3, también una proteína de ligando Wnt secretada. A menos que específicamente se indique lo contrario, WNT3 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso WNT3 humanos NM_030753.3/NP_110380/GI:13540477 (7473/P56703)

5 "WNT7A" se refiere a WNT7A, también una proteína de ligando Wnt secretada. A menos que específicamente se indique lo contrario, WNT7A como se usa en la presente, se refiere a números de acceso WNT7A humanos NM_004625.3/NP_004616/GI:17505191 (7476/000755)

10 "FAM58A" se refiere al miembro A de una familia con similitud de secuencia 58. Este gene contiene un dominio de caja de pliegue de ciclina, puede tener un papel en el control de los ciclos de división celular nuclear. A menos que específicamente se indique lo contrario, FAM58A como se usa en la presente, se refiere a números de acceso FAM58A humanos NM_152274.3/NP_689487/GI:196049382 (92002/Q8N1B3).

"FLJ43860" se refiere a la proteína FLJ43860, una proteína no caracterizada con función desconocida. A menos que específicamente se indique lo contrario, FLJ43860 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso FLJ43860 humanos NM_207414.2/NP_997297/GI:148727311 (389690/Q6ZUA9).

15 "CDKN2A" se refiere a un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A, un inhibidor clave para la progresión del ciclo celular. A menos que específicamente se indique lo contrario, CDKN2A como se usa en la presente, se refiere a números de acceso CDKN2A humanos NM_000077.4/NP_478104/GI:4502749 (1029/P42771).

"OR7G3" se refiere al receptor olfatorio 7G3, uno de los receptores olfatorios acoplados a proteína G(GPCR). A menos que específicamente se indique lo contrario, OR7G3 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso OR7G3 humanos NM_001001958.1/NP_001001958/GI:50080201 (390883/Q8NG95).

20 "DTX3L" se refiere a similar a Deltex-3, una ubiquitina ligasa E3, su homólogo Deltex de Drosophila es un regulador positivo de la señalización de Notch en Drosophila. A menos que específicamente se indique lo contrario, DTX3L como se utiliza en la presente, se refiere a los números de acceso DTX3L humanos NM_138287.3/NP_612144.1/GI:19.923.717(151.636/Q8TDB6). "CCDC168" se refiere a un dominio de espiral enrollada que contiene 168, es una proteína con dominios de espiral enrollada. A menos que específicamente se indique lo contrario, CCDC168 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso CCDC168 humanos NM_001146197.1/NP_001139669.1/GI:226246553 (643677/Q8NDH2).

30 "ZNF527" se refiere a la proteína de dedo de zinc 527, pertenece a la familia de proteínas de dedo de zinc. A menos que se especifique lo contrario, ZNF527 como se usa en la presente, se refiere a números de acceso ZNF527 humanos NM_032453.1/NP_115829/GI: 149192840 (84503/Q8NB42).

"HRAS" se refiere al oncogen viral homólogo del sarcoma de rata Harvey, es una proteína G pequeña que activa la vía de la quinasa MAP. A menos que se especifique lo contrario, HRAS como se usa en la presente se refiere a los números de acceso HRAS humanos NM_005343.2/NM_176795.3/NM_001130442.1/NP_001123914.1/GI: 47117697/GI:194363760/GI: 194 363761 (3265/P01112).

35 "FAT1" se refiere a FAT1, es una proteína de protocadherina, reportada por unirse a β catenina y prevenir su translocación nuclear. A menos que específicamente se indique lo contrario, FAT 1 como se utiliza en la presente, se refiere a números de acceso FAT 1 humanos NM_005245.3/NP_005236/GI:75813622 (2195/Q14517).

40 En la presente, solamente un número de acceso al gen se listó para cualquier gen dado. Se debe entender que cualquier forma de splicing asociada con el gen se contempla por la presente divulgación. Por una forma de splicing se entiende en la presente un ARNm de un solo gen que es empalmado en formas alternativas que resultan en la expresión de múltiples variantes de proteína a partir de un solo gen. Por ejemplo, Notch2 tiene dos variantes de splicing, NM_024408 y NM_001200001. Sólo NM_024408 se listó para Notch2.

45 "Sensibilidad", como se utiliza en la presente significa que una célula o un paciente responde a un inhibidor de Wnt en un sentido que el crecimiento, invasión o metástasis tumoral se retrasa, se detiene, se suprime o se logra la reducción o regresión del tumor, debido al efecto del inhibidor de Wnt. En una realización de la invención, una célula o muestra de paciente tiene "sensibilidad" a un inhibidor de Wnt si la célula o muestra de paciente responde al tratamiento con una reducción de AXIN2 de más de un 50% (inhibición de la vía de Wnt), por ejemplo, reducción de ARNm AXIN2 o niveles de proteína, cuando la célula o muestra del paciente se trata con 10-100 nM del COMPUESTO A durante 48 horas. En una realización específica, una célula o muestra de paciente tiene "sensibilidad" a un inhibidor de Wnt si la célula o muestra de paciente responde al tratamiento con una reducción de más de un 50% en el nivel de ARNm AXIN2, cuando la célula o muestra del paciente es tratada con 50 nM del COMPUESTO A durante 48 horas.

50 Una célula es "sensible" o exhibe "sensibilidad" para inhibición con un inhibidor de Wnt cuando al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1 se reduce diferencialmente en comparación con un control. Alternativamente, una célula es "sensible" para inhibición con un inhibidor de Wnt, cuando más de uno, más de dos, más de tres, o el conjunto entero de biomarcadores se expresan diferencialmente.

55

Una "célula de control" o "célula normal" se refiere a un tejido o célula no canceroso.

Un "tejido de control" o "tejido normal" se refiere a un tejido o célula no canceroso.

Una "muestra de control" o "muestra normal" se refiere a un tejido o célula no canceroso.

5 "Control", como se utiliza en el presente documento es la expresión de biomarcadores en una células de control, tejido de control o muestra de control, o un parámetro o un valor numérico que describe un valor que se correlaciona bien con la expresión de biomarcadores normales o sanos, es decir, la expresión de biomarcadores en una célula normal, no cancerosa, muestra o tejido.

Un "dominio extracelular" Notch1 denota en la presente la región Notch1 de los aminoácidos 1 a 1.735.

10 Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos de polinucleótidos no limitantes: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, EST o etiqueta SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosomal, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, 15 ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. De estar presentes, las modificaciones en la estructura de nucleótidos pueden ser impartidas antes o después del ensamble del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de etiquetado. 20 El término también se refiere a ambas moléculas de hebra sencilla y hebra doble. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta invención que es un polinucleótido abarca tanto la forma de hebra doble y cada una de dos formas de hebra sencilla complementarias conocidas o pronosticadas por comprender la forma de doble hebra.

25 Un "gen" se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto (ORF) que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular, después de ser transcrito y traducido. Una secuencia de polinucleótidos se puede utilizar para identificar fragmentos más grandes o secuencias de codificación de longitud completa del gen con el que están asociados. Métodos para aislar secuencias de fragmentos más grandes son conocidos por los expertos en la técnica.

30 "Expresión de genes", "producto génico" o "expresión" se utilizan todos en la presente indistintamente y se refieren a los ácidos nucleicos o aminoácidos (por ejemplo, péptido o polipéptido) generados cuando un gen se transcribe y traduce, número de copia del biomarcador de ADN, ADN genómico, ADNc o secuencia del biomarcador de ARN; expresión de genes del biomarcador, expresión de la proteína biomarcadora, biomarcador de la expresión de ARNm, efecto funcional de la proteína biomarcadora; efecto funcional del gen biomarcador, ADNc o ARNm; proteínas, ADNc, gen o actividad ARNm, o pérdida de la misma, o una mutación de estado similar a la mutación de desplazamiento de marco, delección, translocación, inserción, duplicación, inversión, mutación funcional; o sus combinaciones. 35

40 En una realización particular "expresión génica", "producto génico" o "expresión" denotan la expresión de ADN, número de copia de ADN, expresión de ARNm, expresión de ADNc, transcripción de proteínas, expresión de proteínas, modificación del ADN, modificación del ADNc, modificación del ARNm, modificación de proteínas, función del ADN, función del ADNc, función del ARNm, función de proteínas, mutación de ADN, mutación de ADNc, mutación de ARNm, mutación de proteínas, o combinaciones de los mismos; preferiblemente es la mutación de ADN. La modificación de ADN incluye alquilación o acilación de ADN. Por ejemplo, la metilación es un proceso bioquímico que implica la adición de un grupo metilo a la citosina o nucleótidos de ADN de adenina. La modificación de ARNm incluye la edición de ARN, que es un proceso bioquímico que implica el cambio de nucleótidos después de que han sido generados por la polimerasa de ARN para formar una secuencia. La modificación de ADNc incluye cualquier modificación que se hizo al nivel de ARNm será traducida en la modificación de ADNc. La modificación de proteínas incluye un proceso bioquímico que implica el cambio de aminoácidos después de que han sido traducidos. La función de proteínas es entendida por las proteínas como llevar a cabo las funciones especificadas por la información codificada en los genes, que incluye la facilitación de la transducción de señalización, reacciones enzimáticas, etc. 45

50 El término "polipéptido" se usa indistintamente con el término "proteína" y en su sentido más amplio se refiere a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos, o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar ligadas mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar ligada mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc.

55 Como se utiliza en la presente, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos ya sean naturales y/o no naturales o sintéticos, y ambos isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos comúnmente denominado un oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido es comúnmente denominado un polipéptido o una proteína.

El término "aislado" significa separado a partir de constituyentes, celulares y de otro tipo, en los que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, se asocian normalmente con la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido aislado se separa de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que normalmente se asocia en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos de origen no natural, no requiere "aislamiento", para distinguirlo de su contraparte de origen natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos "concentrado", "separado" o "diluido", es distinguible de su contraparte de origen natural en que la concentración o número de moléculas por volumen es mayor en una versión "concentrada" o menor en una versión "separada" que la de su contraparte de origen natural. Un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo, o fragmento(s) de los mismos, que difieren de la contraparte de origen natural en su secuencia primaria o, por ejemplo, por su patrón de glicosilación, no necesita estar presente en su forma aislada ya que es distinguible de su contraparte de origen natural por su secuencia primaria o, alternativamente, por otra característica tal como el patrón de glicosilación. Por lo tanto, un polinucleótido de origen no natural se proporciona como una realización separada del polinucleótido de origen natural aislado. Una proteína producida en una célula bacteriana se proporciona como una realización separada de la proteína de origen natural aislada a partir de una célula eucariota en la que se produce en la naturaleza.

Una "sonda" cuando se usa en el contexto de manipulación de polinucleótidos se refiere a un oligonucleótido que se proporciona como un reactivo para detectar un objetivo potencialmente presente en una muestra de interés mediante la hibridación con el objetivo. Por lo general, una sonda comprenderá una etiqueta o un medio mediante el cual una etiqueta puede unirse, ya sea antes o después de la reacción de hibridación. Etiquetas adecuadas incluyen, pero no se limitan a radioisótopos, fluorocromos, compuestos quimioluminiscentes, tintes y proteínas, que incluyen enzimas.

Un "cebador" es un polinucleótido corto, generalmente con un grupo 3'-OH libre que se une a un objetivo o un "molde" potencialmente presente en una muestra de interés mediante la hibridación con el objetivo, y después promoviendo la polimerización de un polinucleótido complementario al objetivo. Una "reacción de cadena de polimerasa" ("PCR") es una reacción en la que las copias replicadas están hechas de un polinucleótido objetivo que utiliza un "par de cebadores" o un "conjunto de cebadores" que consiste en un cebador "corriente arriba" y un cebador "corriente abajo", y un catalizador de polimerización, tal como una polimerasa de ADN, y típicamente una enzima de polimerasa térmicamente estable. Métodos para PCR son bien conocidos en la técnica, y se enseñan, por ejemplo en PCR: A Practical Approach, M. MacPherson, IRL Press en Oxford University Press (1991). Todos los procesos de producción de copias de replicación de un polinucleótido, tal como PCR o clonación de genes, se denominan colectivamente en este documento como "replicación". Un cebador también puede utilizarse como una sonda en reacciones de hibridación, tales como el análisis de transferencia Southern o Northern (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989)).

"Diferencial expresado" como se usa en la presente significa una diferencia medible en la expresión, normalmente cuando se compara con un control. Por ejemplo, cuando se aplica a un gen, puede referirse al estado de mutación diferencial de un gen en comparación con un gen normal, tipo silvestre, funcional en una célula normal. Un gen diferencialmente mutado se puede mutar en comparación con el gen tipo silvestre, lo que provoca la pérdida de función del gen mutado. También puede referirse a la producción diferencial de los ARNm transcritos y/o traducidos a partir del gen o el producto de proteína codificado por el gen. Un gen expresado diferencialmente puede ser sobreexpresado o subexpresado en comparación con el nivel de expresión de una célula normal o de control. Sin embargo, como se utiliza en la presente, la sobreexpresión es un aumento en la expresión génica y generalmente es al menos 1,25 veces o, alternativamente, al menos 1,5 veces o, alternativamente, al menos 2 veces, o alternativamente, al menos 3 veces o alternativamente, al menos 4 veces la expresión sobre aquella detectada en un tejido o célula normal o contraparte de control. Sin embargo, como se utiliza en la presente, subexpresión es una reducción en la expresión génica y generalmente es al menos 1,25 veces o, alternativamente, al menos 1,5 veces o, alternativamente, al menos 2 veces, o alternativamente al menos 3 veces o alternativamente, al menos 4 veces la expresión por debajo de aquella detectada en un tejido o célula normal o contraparte de control. El término "diferencialmente expresado" también se refiere a donde la expresión en una célula de cáncer o tejido canceroso es diferente en comparación con la expresión en un control (por ejemplo, células de control o tejido normal, por ejemplo, células o tejidos no cancerosos). Como un ejemplo, el biomarcador es diferencialmente expresado diferencialmente disminuido si la expresión en una muestra de cáncer es al menos 1.25 veces, o alternativamente, al menos 1,5 veces, o alternativamente, al menos 2 veces o como alternativa, al menos 3 veces o alternativamente, al menos 4 veces menor en comparación con la expresión en un control.

Un nivel de expresión alto del gen puede ocurrir debido a la sobreexpresión del gen o un aumento en el número de copias del gen. El gen también puede traducirse en niveles proteicos aumentados debido a la desregulación o ausencia de un regulador negativo.

El término "ADNc" se refiere a ADN complementario, es decir moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo transformado en ADNc con una enzima tal como la transcriptasa inversa. Una "biblioteca de ADNc" es una colección de todas las moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo, todo transformado en moléculas de ADNc con la enzima de transcriptasa inversa, luego, insertada en "vectores" (otras moléculas de ADN que pueden seguir replicándose después de la adición de ADN extranjero). Los vectores de ejemplo para las bibliotecas incluyen

bacteriófagos (también conocidos como "fagos"), virus que infectan las bacterias, por ejemplo, fago lambda. Luego, la biblioteca puede ser probada para el ADNc específico (y por tanto el ARNm) de interés.

5 Como un ejemplo, la actividad transcripcional puede evaluarse mediante niveles de medición de ARN mensajero utilizando un chip de gen tal como el Affymetrix® HG-U133-Plus-2 GeneChips. Cuantificación en tiempo real, de alto rendimiento de ARN de un gran número de genes de interés de este modo se hace posible en un sistema reproducible.

10 El término "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a las condiciones bajo las cuales una sonda de ácido nucleico se hibridará específicamente con su subsecuencia diana y no con otras secuencias. Las condiciones que determinan la rigurosidad de la hibridación incluyen: temperatura, fuerza iónica, y la concentración de agentes desnaturizantes tales como formamida. La variación de uno de estos factores puede influir en otro factor y un experto en la técnica apreciará los cambios en las condiciones para mantener el nivel deseado de rigurosidad. Un ejemplo de una hibridación altamente rigurosa es: cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0.0015M a 65-68° C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0.0015M, y formamida al 50% a 42° C (ver Sambrook, arriba). Un ejemplo de una hibridación "moderadamente rigurosa" es las condiciones de: cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0.0015M a 50-65° C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0.0015M, y formamida al 20% a 37-50° C. Las condiciones moderadamente rigurosas se utilizan cuando se desea un desfase de una cantidad moderada de ácido nucleico. Un experto en la técnica apreciará que el lavado es parte de las condiciones de hibridación. Por ejemplo, las condiciones de lavado pueden incluir 0.2X-0.1X SSC/SDS al 0.1% y temperaturas de 42 a 68° C, en donde el aumento de la temperatura aumenta la rigurosidad de las condiciones de lavado.

20 Cuando la hibridación ocurre en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos de hebra sencilla, la reacción es llamada "hibridación" y aquellos polinucleótidos se describen como "complementarios". Un polinucleótido de doble hebra puede ser "complementario" o "homólogo" a otro polinucleótido, si la hibridación puede ocurrir entre una de las hebras del primer polinucleótido y el segundo. "Complementariedad" u "homología" (el grado en que un polinucleótido es complementario con otro) es cuantificable en términos de la proporción de bases en hebras opuestas que se espera formen enlaces de hidrógeno entre sí, según las reglas de pareo de bases generalmente aceptadas.

25 Un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) tiene cierto porcentaje (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son los mismos al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, Eds., (1987) Suplemento 30, Sección 07.07.18, Tabla 7.7.1. Preferiblemente, se utilizan parámetros por defecto para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, utilizando parámetros por defecto. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, utilizando los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; Corte: 60; esperado: 10; Matriz=BLOSUM62; Descripciones: 50 secuencias; Clasificado según: Valor más alto; Bases de datos = no redundantes.

35 El biomarcador en la presente incluye variantes de genes y genes con al menos 95% de identidad de secuencia.

El término "trastornos proliferativos celulares" debería incluir la desregulación de la función fisiológica normal caracterizada por el crecimiento celular anormal y/o división o pérdida de la función. Ejemplos de "trastornos proliferativos celulares" incluyen, pero no se limitan a hiperplasia, neoplasia, metaplasia, y diversos trastornos autoinmunes, por ejemplo, aquellos caracterizados por la desregulación de apoptosis de células T.

40 Tal como se utiliza en la presente, los términos "células neoplásicas", "enfermedad neoplásica", "neoplasia", "tumor", "células tumorales", "cáncer" y "células cancerosas" (utilizados indistintamente) se refieren a células que exhiben crecimiento relativamente autónomo, por lo que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular (es decir, división celular de-regulada). Las células neoplásicas pueden ser malignas o benignas. Una célula o tejido metastásico significa que la célula puede invadir y destruir estructuras corporales vecinas.

45 "Cáncer de cabeza y cuello" o "carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello" se utilizan indistintamente y se refieren a un cáncer que surge en la región de la cabeza o cuello. Principalmente es un cáncer de la cavidad nasal, senos paranasales, labios, boca, glándulas salivales, garganta o laringe. 90 por ciento de los cánceres de cabeza y cuello se clasifican como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Es el sexto cáncer principal de incidencia en todo el mundo, con 600.000 casos aproximadamente por año en todo el mundo. Y la tasa de supervivencia de 5 años para pacientes con HNSCC es de 40 a 50% aproximadamente.

50 "Suprimir el crecimiento tumoral" indica una reducción en el crecimiento de células tumorales, que puede evaluarse por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye, pero no está limitado a, la medición del tamaño tumoral, determinación de si las células tumorales están proliferando utilizando un ensayo de incorporación de 3H-timidina, medir la captación de glucosa por imágenes de FDG-PET (tomografía de emisión de positrones de fluorodeoxiglucosa), o conteo de células tumorales. La "supresión" del crecimiento de células tumorales se refiere a cualquiera o todos los siguientes estados: ralentizar, retrasar y detener el crecimiento tumoral, así como la reducción del tumor.

Una "composición farmacéutica" es una combinación de agente activo y otro vehículo, por ejemplo, un compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o etiqueta detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, buffers, sales, disolventes lipófilos, conservantes, adyuvante o similares. Los vehículos también incluyen excipientes farmacéuticos y aditivos, por ejemplo; proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, e hidratos de carbono (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares, y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes solos o en combinación, que comprende solo o en combinación 1-99.99% por peso o volumen. Excipientes de hidratos de carbono incluyen, por ejemplo; monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

Excipientes de proteína de ejemplo incluyen albúmina sérica tal como albúmina sérica humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, y similares. Aminoácidos representativos/componentes de anticuerpos, que también funcionan en la capacidad de regulación de pH, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares.

El término "vehículo" incluye además un buffer o un agente de ajuste de pH; típicamente, el buffer es una sal preparada a partir de un ácido orgánico o base. Buffers representativos incluyen sales ácidas orgánicas tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina, o buffers de fosfato. Vehículos adicionales incluyen excipientes poliméricos/aditivos tales como polivinilpirrolidonas, ficales (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil-cuadratura-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como TWEEN 20™ y TWEEN 80™), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

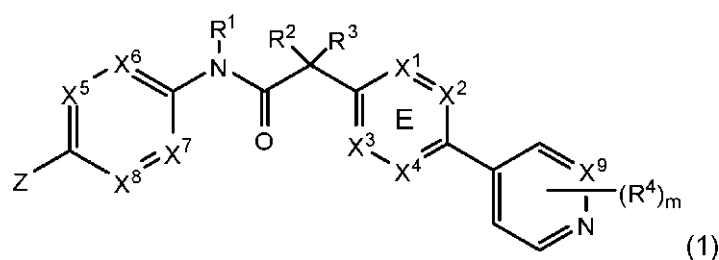
Tal como se utiliza en la presente, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes y cualquiera de los vehículos señalados anteriormente con la condición adicional de que sean aceptables para su uso *in vivo*. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes, véase Remington's Pharmaceutical Science., 15a ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y en la Physician's Desk Reference, 52a ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

Una "cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados en una célula sensible o muestra del paciente, por ejemplo, impide el crecimiento tumoral. También puede denotar una cantidad que inhibe la ruta de Wnt. Una cantidad efectiva puede ser administrada en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones.

Un "sujeto", "individuo" o "paciente" se usa indistintamente en la presente, que se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, ratones, simios, humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas.

Un "inhibidor de Wnt" como se utiliza en la presente reduce la actividad de la ruta de Wnt. Los inhibidores de Wnt son compuestos que pueden inhibir las rutas de señalización de Wnt, e incluyen los inhibidores de PORCN. Esta inhibición puede incluir, por ejemplo, la inhibición de PORCN, y su palmitoilación de Wnt, o reducir la asociación entre los componentes de la vía WNT incluyendo Frizzled y Disheveled. Preferiblemente, un inhibidor de Wnt es un inhibidor PORCN.

En una realización particular el inhibidor de Wnt utilizado para el tratamiento como se describe en la presente es cualquier compuesto adecuado como se describe en el WO2010/101849 A1 (PCT/US10/025813), preferiblemente un compuesto de la Fórmula (1):



o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, en donde:

en donde X¹, X², X³ y X⁴ son seleccionados a partir de N y CR⁷;

uno de X⁵, X⁶, X⁷ y X⁸ es N y los otros son CH;

X⁹ se selecciona a partir de N y CH;

5 Z se selecciona de fenilo, pirazinilo, piridinilo, piridazinilo y piperazinilo; en donde cada fenilo, pirazinilo, piridinilo, piridazinilo o piperazinilo de Z es opcionalmente sustituido con un grupo R⁶;

R¹, R² y R³ son hidrógeno;

m es 1;

R⁴ se selecciona a partir de hidrógeno, halo, difluorometilo, trifluorometilo y metilo;

R⁶ se selecciona a partir de hidrógeno, halo y -C(0)R¹⁰; en donde R¹⁰ es metilo; y

10 R⁷ se selecciona a partir de hidrógeno, halo, ciano, metilo y trifluorometilo.

En particular, el inhibidor de Wnt puede ser un compuesto seleccionado a partir del grupo de N-[5-(3- fluorofenil)piridin-2-il]-2-[5-metil-6-(piridazin-4-il)piridin-3-il]acetamida; 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida; N-(2,3'-bipiridin-6'-il)-2-(2',3-dimetil-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida; N-(5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-2-(2'-metil-3-(trifluorometil)-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida; N-(5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-2-(2'-fluoro-3-metil-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida; y 2-(2'-fluoro-3-metil-2,4'-bipiridin-5-il)-N-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida;

15 bipiridin-5-il)acetamida; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización separada el inhibidor de Wnt es 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida (Compuesto A).

20 Además, un inhibidor de Wnt como se divulga en WO2011/123785 (PCT/US2011/030950) o WO2011/088123 (PCT/US2011/020994) se puede utilizar de acuerdo con la presente divulgación.

Descripción detallada de la invención

Se ha identificado un número de genes que puede servir como un biomarcador para un inhibidor de Wnt. Se enumeran en la Tabla 1. Estos biomarcadores pueden utilizarse para determinar la sensibilidad de pacientes con cáncer al inhibidor y ayudar a controlar la respuesta de aquellos pacientes que reciben el agente terapéutico. Además, biomarcadores bien definidos pueden indicar cual paciente debe recibir un agente terapéutico, es decir, puede utilizarse para la estratificación del paciente y aumentar las posibilidades de que el compuesto provocará eventualmente la respuesta en un paciente. Estos permiten un tratamiento más agresivo y oportuno en oposición a un enfoque de ensayo y error. Los biomarcadores también pueden utilizarse para controlar la eficacia del tratamiento. Si los biomarcadores indican que el paciente se ha vuelto insensible al tratamiento, luego, la dosis administrada se puede aumentar, disminuir, discontinuar completamente o administrar un agente terapéutico adicional. Como tal, los biomarcadores identificados, es decir, cualquier biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 1 es un biomarcador adecuado asociado con inhibidores de Wnt o inhibidores de PORCN. El enfoque de la utilización de los biomarcadores asegura que los pacientes correctos reciben el tratamiento adecuado y durante el curso del tratamiento, el paciente puede ser monitorizado para Wnt continuado, particularmente, sensibilidad al inhibidor PORCN. El paciente con cáncer en el método de tratamiento puede tratarse selectivamente dependiendo de su sensibilidad al inhibidor de Wnt. Los biomarcadores se identificaron mediante la realización de experimentos en líneas celulares y xenoinjertos de ratón, o se determinaron con base en el análisis de la bioinformática.

40 La disminución de la expresión génica de uno o más de los biomarcadores identificados en la presente puede utilizarse para determinar la sensibilidad del paciente a cualquier inhibidor de Wnt, por ejemplo, la disminución o sobreexpresión de un biomarcador indica que un paciente con cáncer es sensible a y respondería favorablemente a la administración de un inhibidor de Wnt, particularmente el compuesto A. Como otro ejemplo, después del tratamiento con un inhibidor de Wnt, una muestra del paciente puede obtenerse y la muestra puede probarse para la sensibilidad para descubrir si el paciente es aún sensible al tratamiento con un inhibidor de Wnt. Alternativamente, una combinación de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 1 se puede ensayar para obtener el resultado. El tratamiento con un inhibidor de Wnt, particularmente aquellos como se definen en la presente, específicamente el compuesto A, puede ser seleccionado. Esto significa que sólo los pacientes que se identifican como sensibles o como aquellos que son propensos a responder al tratamiento con un inhibidor de Wnt, reciben un inhibidor de Wnt. Otros pueden opcionalmente recibir un tratamiento alternativo con otro fármaco.

50 Se ha determinado que variaciones de la expresión génica de dichos biomarcadores, que incluyen la pérdida o ganancia de actividad o función, en una muestra del paciente antes del tratamiento o después del tratamiento, en comparación con una muestra de control, pueden indicar que un paciente responde al tratamiento con un inhibidor de Wnt. Por ejemplo, el inhibidor de Wnt puede ser el compuesto A. Más específicamente, una expresión mayor de WNT11, WNT1 OA, WNT3, WNT7A en una muestra del paciente en comparación con un control indica la sensibilidad

probable del paciente al tratamiento con un inhibidor de Wnt. Por otra parte, la sensibilidad probable del paciente al tratamiento con un inhibidor de Wnt se indica mediante una disminución de expresión de AXIN2, LEF1, NKD1 en comparación con una expresión de control. Si la expresión de Notch1, Notch2 o Notch3 se reduce, o en particular si su actividad o función disminuye, cuando se compara con un control, indica la sensibilidad probable del paciente al tratamiento con un inhibidor de Wnt. Dicha actividad o función puede ser causada por una mutación. Una detección de expresión de SFRP2, FRZB, SFRP4 o DKK2 menor en una muestra del paciente cuando se compara con un control puede indicar la sensibilidad del paciente para el tratamiento con un inhibidor de Wnt. La expresión más baja de FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, FAT1, OR7G3 o DTX3L, en particular su pérdida de función, en comparación con un nivel de control, puede indicar que los pacientes probablemente responderán al tratamiento con un inhibidor de Wnt. Cuando una muestra de paciente muestra una mayor expresión de HRAS, en particular una ganancia en la función, cuando se compara con un control, es más probable una sensibilidad del paciente al tratamiento con un inhibidor de Wnt.

Se ha demostrado que las células de cáncer de cuello y cabeza son altamente sensibles a los inhibidores de Wnt. Los pacientes con cáncer que tienen cáncer de cabeza y cuello pueden beneficiarse del tratamiento con un inhibidor de Wnt. En general, los compuestos de la invención se administrarán en cantidades terapéuticamente eficaces mediante cualquiera de los modos habituales y aceptables conocidos en la técnica, ya sea solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. 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. En general, resultados satisfactorios son indicados para ser obtenidos sistémicamente en dosificaciones diarias de aproximadamente 0.03 a 2.5 mg/kg por peso corporal. Una dosis diaria indicada en el mamífero más grande, por ejemplo, los seres humanos, está en el rango de 0.5 mg a 100 mg aproximadamente, administrada convenientemente, por ejemplo, en dosis divididas hasta cuatro veces al día. Formas adecuadas de dosificación unitaria para administración oral comprenden de 1 a 50 mg aproximadamente de ingrediente activo.

Particularmente pueden beneficiarse del tratamiento con un inhibidor de Wnt, preferiblemente el COMPUESTO A, los pacientes que tienen cáncer de cabeza y cuello que alberga expresión diferencial disminuida del biomarcador seleccionado de la Tabla 1 en comparación con un control. La probabilidad de que dicho paciente responda es la más alta. Por la misma razón el paciente que sufre de otros tipos de tumores también podría ser tratado, siempre y cuando la expresión diferencial del biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 1 es disminuida en su muestra de cáncer en comparación con un control. Una vez el tratamiento con el inhibidor de Wnt comienza, la eficacia del inhibidor puede ser monitoreada al comparar la expresión diferencial de Axin2, LEF1 y/o NKD1 con la expresión en una muestra de cáncer que es sensible a un inhibidor de Wnt. Normalmente, la expresión de Axin2, LEF1 y/o NKD1 se disminuye, si el inhibidor de Wnt es eficaz. La expresión insuficientemente reducida de Axin2, LEF1 y/o NKD1 es indicativa de una necesidad de ajuste en la dosificación, o puede requerir la combinación del inhibidor de Wnt con otro agente anti-tumoral.

35 Medición de la Expresión Génica

La detección de la expresión génica puede ser medida por cualquier método apropiado, incluyendo por ejemplo, la detección de la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen o la cantidad de ADNc producida a partir de la transcripción inversa del ARNm transcrito a partir del gen o la cantidad del polipéptido o proteína codificada por el gen. Estos métodos pueden realizarse en una muestra mediante la base de muestras o pueden modificarse para análisis de alto rendimiento. Por ejemplo, utilizando chips de microarreglo Affymetrix™ U133.

En un aspecto, la expresión génica es detectada y cuantificada mediante la hibridación con una sonda que hibrida específicamente con la sonda apropiada para ese biomarcador. Las sondas también pueden estar unidas a un soporte sólido para uso en ensayos de selección de alto rendimiento utilizando métodos conocidos en la técnica. WO 97/10365 y EE.UU Pat. Nos. 5.405.783, 5.412.087 y 5.445.934, por ejemplo, describen la construcción de los chips de oligonucleótidos de alta densidad que puede contener una o más de las secuencias descritas en la presente. Usando los métodos descritos en la patente EE.UU. Nos. 5.405.783, 5.412.087 y 5.445.934, las sondas de esta invención se sintetizan sobre una superficie derivatizada del vidrio. Los nucleósidos fotoprotectidos de fosoramiditas se acoplan a la superficie de vidrio, se desprotegen selectivamente por fotólisis a través de una máscara fotolitográfica, y se hacen reaccionar con un segundo nucleósido protegido de fosoramidita. El proceso de acoplamiento/desprotección se repite hasta que la sonda deseada se completa.

En un aspecto, el nivel de expresión de un gen se determina mediante la exposición de una muestra de ácido nucleico al chip de sonda modificada. El ácido nucleico extraído es etiquetado, por ejemplo, con una etiqueta fluorescente, preferentemente durante una etapa de amplificación. La hibridación de la muestra etiquetada se realiza a un nivel de rigurosidad apropiado. El grado de hibridación sonda - ácido nucleico se mide cuantitativamente utilizando un dispositivo de detección. Véase la Patente Estadounidense Nos. 5.578.832 y 5.631.734.

Alternativamente cualquier número de copias de genes, transcripción o traducción se puede determinar usando técnicas conocidas. Por ejemplo, un método de amplificación tal como la PCR puede ser útil. Procedimientos generales para PCR se imparten en MacPherson, PCR: Un enfoque práctico, (IRL Press en Oxford University Press (1991)). Sin embargo, las condiciones de PCR utilizadas para cada reacción de aplicación son determinadas empíricamente. Un número de parámetros influyen en el éxito de una reacción. Entre ellos están la temperatura y tiempo de hibridación,

tiempo de extensión, Mg²⁺ y/o concentración de ATP, pH y concentración relativa de cebadores, plantillas y desoxirribonucleótidos. Después de la amplificación, los fragmentos de ADN resultantes pueden ser detectados mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de visualización con tinción de bromuro de etidio e iluminación ultravioleta.

5 En una realización, los ácidos nucleicos hibridados se detectan mediante la detección de una o más etiquetas fijadas a ácidos nucleicos de la muestra. Los marcadores pueden incorporarse mediante cualquiera de un número de medios bien conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, en un aspecto, el marcador se incorpora de forma simultánea durante la etapa de amplificación en la preparación del ácido nucleico de muestra. Así, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) con cebadores marcados o nucleótidos marcados proporcionará un producto de amplificación marcado. En una realización separada, la amplificación de la transcripción, como se describió anteriormente, utilizando un nucleótido marcado (por ejemplo, UTP y/o CTP marcados con fluoresceína) incorpora una etiqueta en los ácidos nucleicos transcritos.

15 Alternativamente, una etiqueta puede agregarse directamente a la muestra de ácido nucleico original (por ejemplo, ARNm, polyA, ARNm, ADNc, etc.) o al producto de amplificación después de que se complete la amplificación. Medios de fijación de etiquetas a ácidos nucleicos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo traducción de una muesca o etiquetado terminal (por ejemplo, con ARN etiquetado) mediante tratamiento con quinasa y una unión (ligación) subsecuente de un enlazador de ácido nucleico conectando a la muestra de ácido nucleico con la etiqueta (por ejemplo, un fluoróforo).

20 Etiquetas detectables adecuadas para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, medios eléctricos, ópticos o químicos. Etiquetas útiles en la presente invención incluyen: biotina para la tinción con conjugado de estreptavidina marcada, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína fluorescente verde, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, 3H, 1251I, 35S, 14C, o 32P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras comúnmente utilizadas en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc). Las patentes que enseñan el uso de tales etiquetas incluyen las patentes de EE.UU Nos. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241.

25 La detección de etiquetas es bien conocida por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, los marcadores radiactivos se pueden detectar usando una película fotográfica o un contador de centelleo, marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan típicamente al proporcionar la enzima con un sustrato y al detectar el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas colorimétricas son detectadas simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

30 La etiqueta detectable puede ser agregada al ácido nucleico diana (muestra) antes de, o después de la hibridación, tal como se describe en WO 97/10365. Estas etiquetas detectables se unen directamente a o se incorporan en el ácido nucleico diana (muestra) antes de la hibridación. En contraste, las "etiquetas indirectas" se unen al dúplex híbrido después de la hibridación. Generalmente, la etiqueta indirecta está unida a una fracción de unión que se ha unido al ácido nucleico diana antes de la hibridación. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser biotinilado antes de la hibridación. Después de la hibridación, un fluoróforo conjugado a avidina se unirá a los dúplex híbridos que llevan biotina proporcionando una etiqueta que es fácilmente detectada. Para una revisión detallada de los métodos de etiquetado de ácidos nucleicos y de detección de ácidos nucleicos hibridados etiquetados, véase las Técnicas de Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, vol. 24: Hybridization with Nucleic Acid Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Detección de polipéptidos

35 El nivel de expresión del biomarcador también puede determinarse mediante el examen de expresión de proteína o el producto de proteína de al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1. La determinación del nivel de proteína implica medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica que se produce entre un anticuerpo que reconoce selectivamente y se une al polipéptido del biomarcador en una muestra obtenida de un paciente y comparar esto con la cantidad de unión inmuno-específica de al menos un biomarcador en una muestra de control. La cantidad de expresión de proteína del biomarcador puede ser aumentada o reducida en comparación con la expresión de control. Alternativamente, una combinación de más de un de los biomarcadores seleccionados a partir de la Tabla 1 se puede ensayar.

40 Una variedad de técnicas están disponibles en la técnica para el análisis de proteínas. Estas incluyen, pero no se limitan a radioinmunoensayos, ELISA (ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima), inmunoensayos "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos in situ (usando, por ejemplo, oro coloidal, enzimas o etiquetas de radioisótopos), análisis de transferencia Western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica, microscopía confocal, ensayos enzimáticos, resonancia de plásmos superficiales y PAGE-SDS.

Ensayo para biomarcadores y el tratamiento con un inhibidor de Wnt

Una vez que un paciente ha sido pronosticado como sensible a un inhibidor de Wnt, la administración de cualquier inhibidor de Wnt a un paciente puede efectuarse en una dosis continua o intermitentemente durante el curso de tratamiento. Los métodos para determinar los medios y dosis de administración más eficaces son bien conocidos por los expertos en la técnica y variarán con la composición utilizada para la terapia, el propósito de la terapia, la célula diana que se está tratando, y el sujeto a tratar. Las administraciones únicas o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosificación y el patrón que está siendo seleccionado por el médico tratante. Las formulaciones de dosificación adecuadas y métodos de administración de los agentes pueden ajustarse empíricamente.

Al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1 puede probarse después de la administración de un inhibidor de Wnt con el fin de determinar si el paciente sigue siendo sensible al tratamiento con un inhibidor de Wnt.

Además, al menos un biomarcador puede ensayarse en múltiples puntos de tiempo después de una única administración del inhibidor. Por ejemplo, un bolo inicial de un inhibidor de Wnt se administra, al menos un biomarcador se ensaya durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después del primer tratamiento. Alternativamente, más de uno, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o todos los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, pueden ensayarse en conjunto.

El al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 puede ensayarse después de cada administración de un inhibidor de Wnt, así que si hay múltiples administraciones de inhibidores de Wnt, al menos un biomarcador puede ensayarse después de cada administración para determinar si la sensibilidad del paciente continua. El paciente podría someterse a múltiples administraciones de un inhibidor de Wnt y los biomarcadores podrían ensayarse en diferentes puntos de tiempo. Por ejemplo, un curso de tratamiento puede requerir la administración de una dosis inicial de un inhibidor de Wnt, una segunda dosis un tiempo después, y una tercera dosis horas después de la segunda dosis. Al menos un biomarcador podría ensayarse durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración de cada dosis de un inhibidor de Wnt. Alternativamente, más de uno, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o todos los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, pueden ensayarse en conjunto.

También se divulga que diferentes biomarcadores se analizan durante diferentes puntos de tiempo. Sin estar ligado a ninguna teoría, debido al mecanismo de acción del inhibidor de Wnt o del biomarcador, la respuesta al inhibidor de Wnt se retrasa y al menos un biomarcador se ensaya durante cualquier periodo de tiempo después de la administración para determinar si el paciente sigue siendo sensible a la administración del fármaco. Un ensayo para al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 después de cada administración de un inhibidor de Wnt proporcionará orientación en cuanto a los medios, dosis y curso del tratamiento.

Por último, está la administración de diferentes inhibidores de Wnt y seguido por el ensayo de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1. En esta realización, se elige más de un inhibidor de Wnt y se se administran al paciente. Al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 puede ensayarse después de la administración de cada inhibidor de Wnt diferente. Como el anterior, este ensayo también puede realizarse en múltiples puntos de tiempo después de la administración de los diferentes inhibidores de Wnt. Por ejemplo, un primer inhibidor de Wnt podría administrarse al paciente y al menos un biomarcador podría ensayarse durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración. Un segundo inhibidor podría administrarse y al menos un biomarcador podría ensayarse de nuevo durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración del segundo inhibidor de Wnt. Alternativamente, más de uno, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o todos los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, pueden ensayarse en conjunto.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de evaluación para niveles de dosificación adecuados de un inhibidor de Wnt, que comprende el control de la expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores después de la administración del inhibidor de Wnt. Por ejemplo, después de la administración de un primer bolo de inhibidor de Wnt, se analiza al menos un biomarcador y con base en este resultado, se recomienda un aumento o disminución en la dosis del inhibidor de Wnt. Después de la administración de la dosis ajustada del inhibidor de Wnt el análisis de al menos un biomarcador se determinará si el paciente es todavía sensible a la dosis ajustada y si la dosis ajustada este proporcionando el beneficio esperado, por ejemplo, la supresión del crecimiento tumoral. Alternativamente, más de uno, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o todos los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, pueden ensayarse en conjunto para medir la sensibilidad a la dosis del inhibidor de Wnt.

En alternativa a todas las realizaciones para medir la eficacia extendida de un inhibidor de Wnt en el tumor inicialmente sensible, la expresión diferencial de NKD1, LEF1 y/o Axin2 puede compararse con la expresión en una muestra tumoral sensible. La muestra tumoral sensible también se define como un tumor que muestra más de 50% de reducción Axin2 (inhibición de la vía Wnt) con el tratamiento de 50 nM de compuesto A durante 48 horas.

Kits para la evaluación de la actividad de cualquier inhibidor de Wnt se pueden hacer. Por ejemplo, un kit que comprende cebadores de ácidos nucleicos para PCR o para la hibridación con el microarreglo para los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1 se puede utilizar para medir la sensibilidad a un inhibidor de Wnt. Alternativamente, un kit suministrado con anticuerpos para al menos uno de los biomarcadores sería útil en el ensayo de sensibilidad para un inhibidor de Wnt.

5 Es bien conocido en la técnica que los cánceres pueden volverse resistentes al tratamiento quimioterapéutico, especialmente cuando el tratamiento es prolongado. El ensayo para la expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1 puede hacerse después del tratamiento prolongado con cualquier quimioterapéutico para determinar si el cáncer es sensible al inhibidor de Wnt. Si el paciente ha sido tratado previamente con otro quimioterapéutico u otro inhibidor de Wnt, es información útil para el paciente para ensayar al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1 para determinar si el tumor es sensible a un inhibidor de Wnt. Este ensayo puede ser especialmente beneficioso para el paciente si el cáncer entra en remisión y luego se desarrolla nuevamente o hace metástasis a un sitio diferente.

Clasificación de inhibidores de Wnt

10 Es posible ensayar para al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 1 para clasificar otro inhibidor de Wnt. Este método comprende ensayar una célula con al menos un biomarcador, que predice si la célula es sensible a un inhibidor candidato de Wnt, la célula se pone en contacto con el inhibidor de Wnt candidato y el CI50 de la célula tratada se compara con un inhibidor de Wnt conocido puesto en contacto con una célula sensible. Por ejemplo, para células pronosticadas como sensibles a cualquier inhibidor de Wnt como se determina por la expresión diferencial de al menos un biomarcador, el inhibidor de Wnt candidato tendrá un CI50 < 3 uM. La medición de al menos una expresión de biomarcadores se puede realizar por los métodos descritos anteriormente, por ejemplo, PCR o análisis de microarreglos. Alternativamente, la combinación de más de uno de los biomarcadores se puede ensayar para estos fines.

20 TABLA 1

Nombre del Gen (Compuesto)	Número de Acceso	SEC ID NO. (nucleótido/proteína)
Notch1	NM_017617.3/NP_060087/GI: 148833508	4851/P46531
Notch2	NM_024408.3/NP_077719/G1:24041035	4853/Q04721
Notch 3	N M_000435.2/N P_000426/G1:134244285	4854/Q9UM47
AXIN2	N M_004655.3/N P_004646/G1:195927059	8313/Q9Y2T1
LEF1	NM_016269/NP_001124185/GI7705917	51176/Q9UJU2
NKD1	N M_033119/N P_149110/GI:14916433	85407/Q969G9
SFRP2	NM_003013.2/N P_003004/GI:48475052	6423/Q96HF1
FRZB	N M_001463.3/N P_001454/GI:38455388	2487/Q92765
SFRP4	N M_003014.3/N P_003005/GI:170784838	6424/Q6FHJ7
DKK2	N M_014421.2/N P_055236/G1:7657023	27123/Q9UBU2
FAM58A	NM 152274.3/NP 689487/GM96049382	92002/Q8N1B3
FLJ43860	NM 207414.2/NP 997297/GM48727311	389690/Q6ZUA9
OR7G3	NM 001001958.1/NP 001001958/GI:50080201	390883/Q8NG9 5
CCDC168	NM 001146197.1/NP 001139669.1/GI:226246553	643677/Q8NDH 2
ZNF527	NM 032453.1/NP 115829/GI: 149192840	84503/Q8NB42
CDKN2A	NM 000077.4/NP 478104/GI:4502749	1029/P42771
OR7G3	NM 001001958.1/NP 001001958/GI:50080201	390883/Q8NG9 5
WNT11	NM 004626.2/NP 004617/GI:17017974	7481/096014
WNT10A	NM 025216.2/NP 079492/GI: 16936520	80326/Q9GZT5
WNT3	NM 030753.3/NP 110380/GI: 13540477	7473/P56703
NT7A	NM 004625.3/NP 004616/GI:17505191	7476/000755

DTX3L	NM 138287.3/NP 612144.1/GI:19923717	151636/Q8TDB6
HRAS	NM 005343.2/NM 176795.3 NM 001130442.1/NP 001123914.1/GI:47117697/GI:19436376 0/GI: 194363761	3265/ P01112
FAT1	NM 005245.3/NP 005236/GI75813622	2195/Q14517

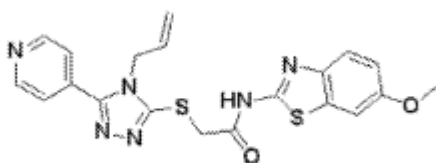
Ejemplos

Ejemplo 1: El COMPUESTO A y el COMPUESTO B (Figura 1A y 1B, respectivamente) son inhibidores potentes de PORCN en ensayos bioquímicos y celulares.

- 5 Ensayo de unión de radioligando Preparación de la Membrana: Aproximadamente 108 293 células fueron transfectadas con constructos ADNpc 3.1 (Invitrogen) que llevan PORCN humano utilizando Fugene 6 (Roche). Después de 48 horas, las células se recogieron por raspado en PBS, se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos. El buffer se aspiró. Los pellets de las células fueron congelados en un baño de hielo seco, luego fueron resuspendidos en 10m de un buffer Tris 50 mM pH 7.5, sacarosa 250 mM que contiene un cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA (Sigma). Las células fueron sometidas a lisis utilizando polytron (Brinkman). Las células lisadas se centrifugaron a 1600 X g durante 20 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se transfirió y se centrifugó a 20.000 rpm en un rotor SS34 durante 20 minutos a 4° C. Los sobrenadantes se desecharon y los pellets se re-suspendieron en sacarosa al 10%, Tris 50 mM pH 7.5, MgCl2 5 mM, solución de EDTA 1 mM utilizando tres pulsos de 10 segundos con un Polytron.

Etiquetado de radioligandos del COMPUESTO B: Compuesto C, su estructura se lista a continuación,

15



se radio-etiquetó a través de la reacción de hidrogenación hecha por AmBioslabs, para preparar un COMPUESTO B ³H-radio-etiquetado.

- 20 Ensayo de unión de radioligandos: Utilizando las preparaciones de membrana antes mencionadas, los ensayos de unión de filtración se realizaron de la siguiente manera. Para reducir la unión no específica, placas de filtración de 96 pozos (PerkinElmer) fueron pre-recubiertas según lo sugerido por el fabricante con BSA al 0.1% y después se lavó cuatro veces con BSA al 0.1%. Las preparaciones de membrana (proteína total de 50 µg) se incubaron en placas de polipropileno de 96 pozos con 3H-compuesto B 6.6 nM en presencia o ausencia del COMPUESTO A en buffer de unión (Tris 50 mM pH 7.5, MgCl2 5 mM, EDTA 1 mM, albúmina de suero bovino al 0.1 %) más cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA (Sigma) en un volumen final de 150 µl durante 3 horas a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción de unión se transfirieron luego a las placas pre-revestidas de filtración de 96 pozos (PerkinElmer), se filtraron y se lavaron usando un recolector FilterMate de 96 puntas (PerkinElmer). Las señales radiactivas se obtuvieron utilizando un Contador de Centelleo de Microplacas, TopCount (PerkinElmer). Las actividades de unión del radioligando PORCN fueron medidas mediante topCount (PerkinElmer). El ajuste de curvas se realizó con Prism.

- 35 Como se muestra en la Figura 2A, el COMPUESTO B marcado con tritio se unió en gran medida a las preparaciones de membrana a partir de 293 células transfectadas con PORCN pero no a aquellas a partir de células sin Wnt o transfectadas con vectores de control, que muestra que el COMPUESTO B interactúa específicamente con PORCN. Además, la interacción específica entre el COMPUESTO B y PORCN puede ser contrarrestada por el COMPUESTO B sin etiqueta (Figura 2A). EL COMPUESTO B se unió a PORCN y sirvió como radioligando caliente en el ensayo de unión a PORCN bioquímico in vitro, para competencia con los compuestos de prueba en frío. En el ensayo de unión de radioligando a PORCN utilizando 3H-COMPUESTO B, el COMPUESTO A mostró una IC50 de 1 nM (Figura 2B).

Ejemplo 2: La Inhibición de PORCN por el COMPUESTO A bloquea la señalización de Wnt in vitro

- 40 Ensayo del gen reportero: Las células TM3 de células de Leydig de ratón (obtenidas de American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) se cultivaron en mezcla 1:1 de medio F12 de Ham y medio de Eagle modificado de Dulbecco (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con FBS al 2.5% (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) y suero

de caballo al 5% (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), 50 unidades/ml de penicilina y 50 ug/ml de estreptomina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37° C con CO₂ al 5 % en atmósfera de aire. Las células TM3 en un plato de 10 cm se co-transfectaron con 8 ug de plásmido STF-reportero que contiene un gen de luciferasa promovido por elementos sensibles a Wnt y 2 ug de pcDNA3.1-Neo (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) con 30 uL de FuGENE6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) siguiendo el protocolo del fabricante. Las líneas celulares estables (TM3 Wnt-luc) se seleccionaron con 400 ug/ml de G418 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células TM3 Wnt-Luc y las células L-cell Wnt3A (obtenidas en la American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA; se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con FBS al 10% (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) y 50 unidades/mL de penicilina y 50 ug/mL de estreptomina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37° C con CO₂ al 5% en atmósfera de aire) son tripsinizadas y co-cultivadas en una placa de 384-pozos con medio DMEM suplementado con FBS al 2%, y tratadas con diferentes concentraciones de un compuesto de la invención. Después de 24 horas, las actividades de luciferasa de luciérnaga se ensayan con el Sistema de Ensayo de Luciferasa Bright-Glo™ (Promega, Madison, WI). La CI50 se mide cuando el efecto del compuesto reduce la señal de luminiscencia en 50%.

El COMPUESTO A inhibió potentemente la señalización de Wnt en el ensayo de co-cultivo de Wnt con una IC50 de 0.4 nM (Figura 3A). Este efecto inhibitorio fue rescatado por la adición de medio acondicionado de Wnt3A exógeno (Figura 3B). Para confirmar aún más su función en la secreción de Wnt dependiente de PORCN, las células 293A se transfectaron con Wnt3a marcada con HA (HA-Wnt3A) y se trataron con diversas dosis de COMPUESTO A. Como se muestra en la Figura 4, el COMPUESTO A potentemente atenúa la abundancia de HA-Wnt3A en el sobrenadante mientras se dispersa el lisado HA-Wnt3A, lo que sugiere que la secreción de Wnt3A fue inhibida sustancialmente por el COMPUESTO A de una manera dependiente de la dosis. Posteriormente, las Wnts secretadas funcionan en células receptoras de Wnt que conducen a la fosforilación del co-reportero de Wnt LRP6. Usando las células L-Wnt3A autocrinas, una línea de células de mama de ratón que sobreexpresan Wnt3A, se ha demostrado que el COMPUESTO A en realidad bloqueó fuertemente la fosforilación dependiente de Wnt de LRP6 (proteína 6 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad) (Figura 5A). Se reportó que PORCN afecta la palmitoilación post-traducciona de pan-Wnt¹⁷⁻¹⁸. Los residuos alrededor del sitio de palmitoilación de Wnt putativo, Ser209, se conservan entre todos los 19 Wnts (Figura 5B), y el motivo de palmitoilación CHGxSGSC no se identificó en cualquier otra proteína en todo el proteoma. Para probar si el COMPUESTO A puede recapitular la consecuencia de la pérdida de PORCN genéticamente, nos centramos en un conjunto de Wnts canónicas en los ensayos reporteros de STF dependiente de Wnt, incluyendo Wnt1, 2, 3, 3A, 6, 7A y 9A. Como se muestra en la Figura 5C, el COMPUESTO A demostró actividades inhibitorias comparables contra todos los Wnts probados, lo cual es consistente con la pérdida del fenotipo PORCN. Además, el COMPUESTO A no mostró citotoxicidad mayor en células hasta 20 uM.

Ejemplo 3: Efectos funcionales celulares de un inhibidor de Wnt en líneas celulares humanas de cáncer de cabeza y cuello

Para identificar líneas celulares de cáncer humano que respondan a inhibición de Porcupine, se perfilaron más de 300 líneas celulares utilizando el nivel de expresión de ARNm de AXIN2 como lectura. Todas las líneas celulares se cultivaron en una incubadora humidificada a 37° C con CO₂ al 5%. Las células HN30 (Universidad Estatal de Wayne) y células UMSCC (Universidad de Michigan) se derivan de muestras tumorales de pacientes humanos con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). Se aisló ARN o ADN total utilizando el kit de sangre y tejido RNeasy y DNeasy Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, respectivamente. Brevemente, las células fueron alteradas por la adición de buffer RLT y se homogeneizaron utilizando columnas de centrifugación QIAshredder. Después se añadió un volumen de etanol al 70% al lisado homogenizado y se mezcló completamente, las muestras se transfirieron a la columna de centrifugación RNeasy. El flujo corriente fue descartado después de la centrifuga. Después de lavar las columnas de centrifugación RNeasy con buffer RW1 y buffer RPE dos veces, las muestras de ARN se recogieron mediante la elución de columnas de centrifugación RNeasy con agua libre de RNasa. Para el Ensayo TaqMan, 2 x 10⁶ células por pozo se sembraron en placas de cultivo celular de 6 pozos y se trataron con o sin compuesto en una respuesta de dosis multi-punto empezando desde 5 uM como la concentración final más alta. 48 horas más tarde, se recogieron muestras de ARN.

Una línea celular sensible se define como aquella que consigue una reducción de ARNm de AXIN2 de más del 50% después del tratamiento con 10-100 nM del COMPUESTO A durante 48 horas, preferiblemente después de tratamiento con 50 nM del COMPUESTO A durante 48 horas. Como se muestra en la Figura 6, las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello (HNSCC) se encuentran entre los principales tipos de cáncer sensibles al COMPUESTO A. Entre las líneas celulares HNSCC, 31 de 96 mostraron una inhibición de la vía tras el tratamiento del COMPUESTO A (Figura 7).

Con el fin de correlacionar la inhibición de la vía con la función celular, la línea celular humana de HNSCC HN30 se utilizó para caracterización adicional in vitro e in vivo. Para el ensayo de formación de colonias, 2 x 10³ células por pozo se sembraron en placas de cultivos celulares de 6 pozos con o sin tratamiento de compuestos. Las células se tiñeron con cristal violeta una semana más tarde.

El COMPUESTO A inhibió potentemente la producción de mensajes de AXIN2 dependientes de Wnt con una CI50 de 0.3 nM (Figura 8A). Esto atenuó fuertemente la formación de colonias HN30 aunque con un CI50 desplazado a la derecha (Figura 8B). El efecto de formación reducida de colonias por el COMPUESTO A puede ser parcialmente

rescatado con la sobreexpresión de β -catenina dominante (Figura 9A). Para confirmar aún más si el efecto celular del COMPUESTO A era debido a la inhibición de las actividades de señalización de Wnt dependientes de PORCN, se realizaron experimentos de ARNsh. ARNsh contra PORCN inhibe sustancialmente la expresión del gen diana de Wnt AXIN2 (Figura 9B) y la formación de colonias de células HN30 in vitro (Figura 9C), consistente con los datos del COMPUESTO A.

Ejemplo 4: Eficacia de un inhibidor de Wnt en un modelo de ratón de HNSCC humano dependiente de Wnt

Para probar la actividad anti-tumoral del COMPUESTO A, se estableció un modelo de xenoinjerto de ratón de HNSCC HN30. Ratones desnudos portadores de tumores HN30 fueron aleatorizados de acuerdo con el volumen del tumor. El COMPUESTO A se formuló en 10% de buffer de citrato pH 2.8/90% de buffer de citrato pH 3.0, o 0.5% MC/0.5% de Tween 80 y se administró por sonda oral en un volumen de dosificación de 10 μ L/g de peso corporal de un animal. El peso corporal se controló diariamente y tamaños tumorales se evaluaron tres veces a la semana una vez que los tumores eran palpables. Tamaños de los tumores se determinaron mediante el uso de mediciones con calibrador. Los volúmenes tumorales se calcularon con una fórmula (Largo x Ancho x Alto)/2. Las concentraciones plasmáticas y las exposiciones del COMPUESTO A en ratones desnudos portadores de tumor (n=2 por grupo de dosificación) se determinaron en el día 14. La muestra de sangre (50 μ L) se recogió por muestreo retroorbital en serie 1, 3, 7, 16 y 24 horas después de la dosis. Las muestras de sangre se centrifugaron y el plasma se separó y se congeló hasta el análisis por LC/MS/MS.

Como se muestra en la Figura 10A, el COMPUESTO A indujo eficacia dependiente de la dosis cuando se administra una vez al día. Los cambios en el peso del tumor para cada grupo tratado (T) y de control (C) se midieron y se utilizaron para calcular el retraso del crecimiento tal como se expresa por la proporción T/C. Después de 14 días de tratamiento, una dosis de 0.1 mg/kg dio lugar a retraso del crecimiento tumoral moderada (T/C: 69%), y una dosis de 0.3 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento del tumor (T/C: 26%), y las dosis de 1.0 y 3.0 mg/kg resultaron en la regresión sustancial del tumor (T/C: -31% y -50%, respectivamente) (Figura 10A). El régimen fue bien tolerado y no había pérdida significativa de peso corporal del animal. Se obtuvo un resultado similar cuando se dosifica dos veces al día en este modelo con -44% T/C a una dosis de 0.5 mg/kg dos veces al día.

Los niveles de ARNm de AXIN2 y pLRP6 (determinado como en el Ejemplo 3) se utilizaron como marcadores farmacodinámicos para vincular la actividad anti-tumoral observada en el modelo de xenoinjerto de ratón HN30. Después de una sola dosis de COMPUESTO A en 3 mg/kg, los niveles de expresión de ARNm de AXIN2 en los tumores se redujeron en ~ 60-95% entre 5 y 10 horas después de la dosis y el efecto comenzó a disminuir a las 16 horas junto con la disminución de las concentraciones de fármacos (Figura 10B). Se observó un retardo de tiempo entre el pico de concentración del fármaco (en 1 hora) y la inhibición de ARNm de AXIN2 máxima (en 10 horas). Adicionalmente, como se muestra en la Figura 10C, los niveles de pLRP6 en los tumores HN30 se redujeron sustancialmente de una manera dependiente del tiempo. El efecto máximo se alcanzó a las 7-10 horas después de la dosis y los niveles de pLRP6 estaban en gran parte de vuelta a la normalidad en 24 horas. El tratamiento con el COMPUESTO A también causó 84% de disminución para LEF1 y 67% de disminución para NKD1. Este farmacocinético (PK), PD, y la relación de eficacia explica que la inhibición de la vía sostenida no se requiere para inducir la regresión del tumor en este modelo de xenoinjerto de HN30, que puede proporcionar un factor de diferenciación clave entre tumores y tejidos normales para lograr una ventana terapéutica. Se puede concluir que un inhibidor de Wnt, en particular un compuesto A se puede utilizar en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello.

Ejemplo 5: Predicción de sensibilidad del inhibidor de Wnt en el modelo de xenoinjerto de ratón de tumor primario humano y en tumores primarios humanos mediante la evaluación de la expresión génica de Notch1. Notch2. Notch3. LEF1. NKD1. SFRP2. FRZB. SFRP4 y DKK2:

Para examinar otros genes relacionados con Wnt regulados por el tratamiento del COMPUESTO A en vivo, un análisis de TaqMan® GeneCard reveló disminución de varios otros genes diana de Wnt LEF1 y NKD1 conocidos, así como ligandos Wnt, incluyendo Wnt3 y Wnt9b.

Para ello se realizó un análisis TaqMan RT-PCR de dos pasos en un termociclador Peltier PTC-200 (MJ Research) y un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). En primer lugar, el ADNc se sintetizó usando un kit de archive de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, la reacción RT se preparó mezclando componentes no enzimáticos, enzimáticos del kit Archive de ADNc de alta capacidad y muestras de ARN aislado, seguido de incubación en tándem a 25° C durante 10 min y 37° C durante 120 min usando un ciclador térmico. En segundo lugar, los análisis TaqMan se realizaron utilizando TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) y sondas AXIN2 y GAPDH (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, la reacción PCR Fue preparado mediante la mezcla del mix maestro universal, sondas TaqMan y muestras sintetizadas de ADNc. El ciclo de PCR es como sigue: 95 °C durante 10 min y 40 ciclos de incubación tándem a 95 ° C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 min. los niveles de expresión de ARNm para los genes diana se normalizaron a los niveles de ARNm de GAPDH y los datos fueron analizados mediante el software SDS 2.0 (Applied Biosystems) para calcular las cantidades relativas de ARN. El ajuste de curvas se realizó con Prisma.

Para el análisis de la GeneCard, se usaron tarjetas de arreglos de genes TaqMan de 96 pozos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ensayos de la tarjeta de genes se ejecutaron en ABI 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y se analizaron con el método $\Delta\Delta Ct$.

5 Al comparar los patrones de expresión génica entre los tumores HN30 y tejidos de la orofaringe humanos normales usando el análisis GeneCard, ligandos Wnt, incluyendo Wnt3, 7A, 10A y 11 se sobreexpresan sustancialmente en los tumores HN30 mientras que los genes inhibidores de Wnt conocidos tales como SFRP2, FRZB, SFRP4 y DKK2 fueron sustancialmente disminuidos, lo cual es consistente con la hipótesis de que la señalización de Wnt es un objetivo etiológico. Estos datos indican que es más probable para una línea celular, muestra de cáncer o un paciente que tiene un tipo de cáncer sea sensible a un inhibidor de Wnt si la expresión de genes SFRP2, FRZB, SFRP4 o DKK2 se encuentra diferencialmente disminuida en comparación con un control. Muestra de cáncer o un cáncer que tiene la expresión de genes SFRP2, FRZB, SFRP4 o DKK2 diferencialmente disminuida en comparación con un control son más propensos a ser sensibles a un inhibidor de Wnt en comparación con una muestra de cáncer o un cáncer que exhibe la expresión génica comparable a un control. Esta noción se puede aplicar en un proceso de estratificación de los pacientes, donde se seleccionan y se tratan pacientes que probablemente respondan al tratamiento con un inhibidor de Wnt.

Con el fin de entender mejor el mecanismo de acción en las células que respondieron al tratamiento con el COMPUESTO A, incluyendo las células HN30, la secuenciación del exoma se realizó en 40 líneas celulares HNSCC, con 25 líneas sensibles y 15 líneas no sensibles. TP53, CDKN2A, Notch 1/2/3, PTEN, HRAS y PIK3CA estaban entre los mejores oncogenes o genes supresores de tumores mutados en este conjunto de líneas celulares (Figura 11).

20 Preparación y secuenciación de la biblioteca de captura del exoma entero: La Construcción de la Biblioteca de Captura del Exoma se realizó utilizando el kit de enriquecimiento del exoma Roche NimbleGen V2 (44.1 Mbps) (Otogenetics). La secuencia de terminación apareada (2 x 100 pb) de los exones capturados se llevó a cabo en una plataforma Illumina Genoma Analyser Ix con una cobertura promedio de 50X (Otogenetics).

25 Procesamiento de datos de secuenciación: Los datos de secuenciación se procesan mediante una tubería estándar recomendada por el Broad Institute Genome Atlas Tool Kit (GATK):

Los archivos primarios fastq de secuenciamiento con lecturas y registros de calidad para cada muestra fueron alineadas al genoma humano de referencia NCBI GRCh37 usando el alineador Burrows-Wheeler versión 0.5.9 (<http://bio-bwa.sourceforge.net>). Para cada muestra, se generó un único archivo Mapa de Alineación Biano (BAM) con sus alineaciones al genoma de referencia.

30 Los archivos BAM de la alineación se limpiaron adicionalmente usando el método de "realineamiento a nivel de la muestra con índices conocidos y recalibración". (<http://www.broadinstitute.org/gatk/guide>)

35 El genotipador unificado GATK fue usado para cada archivo BAM limpio y recalibrado para generar SNP, Polimorfismo Múltiple de Nucleótido (MNP), e inserciones y deleciones. Después de la reunión de las variantes para cada muestra, estas fueron fusionadas en SNP de múltiples muestras y reunión de inserciones y deleciones. Los archivos de las Variantes reunidas de Formato separado (VCF) fueron producidos por SNP y reunión de inserciones y deleciones.

Todas las variantes de las llamadas fueron procesadas por SnpEff (v2.1b <http://snpeff.sourceforge.net/>) para predecir sus impactos funcionales sobre productos proteicos correspondientes, y según el anotador de variantes GATKs para anotaciones adicionales. Varias bases de datos públicamente disponibles, incluyendo dbSNP v. 135, COSMIC V.58 y ESP5400 se utilizaron para mapear los cambios genómicos a las variantes conocidas.

40 Análisis de variantes: Para reducir el artefacto de secuenciación, se emplearon varias filtraciones, incluyendo la variante de calidad <30, calidad del mapeo <30, confianza variante <2, y similitudes normalizadas de la escala de Phred > 80. Hay un total de 18.349 genes que albergan cambios genómicos en comparación con el exoma de referencia. El número total de cambios genómicos en todas las 40 líneas celulares CECC es de 169k aproximadamente. Sin embargo, la mayoría de ellas (89%) son las variantes conocidas anotadas en las bases de datos públicas antes mencionadas. Entre las nuevas variantes, aproximadamente la mitad (6% del total) de las variantes resulta en una modificación de secuencias de proteínas, tales como mutaciones, truncamientos, inserciones y deleciones. Nótese que el secuenciamiento disponible fue para líneas celulares donde el normal no coincidente estaba disponible. Por lo tanto, algunos de las variantes novedosas vistas aquí potencialmente podrían ser SNPs. Las mutaciones adquiridas durante el pasaje de línea celular también son posibles y no se pueden distinguir de aquellas adquiridas durante el desarrollo y progresión del cáncer. Las líneas UM-SCC tienen cada una genotipos únicos y se utilizaron al menor número posible de pasaje generalmente menor a 100 pasajes desde el cultivo inicial.

55 Los impactos de los cambios genómicos funcionales fueron evaluados por SnpEff. Las mutaciones de alto impacto incluyen el desplazamiento del marco, mutaciones en el sitio de splicing, pérdida del codón de inicio, ganancia del codón de terminación y la pérdida del codón de terminación. Las mutaciones de impacto moderadas incluyen la inserción o deleción en marco y las mutaciones no sinónimas. La mutación germinal potencial se determinó si bien la mutación está anotada en dbSNP con origen de alelo SNP (SAO) <2 o en una entrada ESP5400 y no en COSMIC.

Para estudiar la correlación entre la pérdida de mutaciones de función y la función farmacológica del COMPUESTO A, se agregaron todas las variantes de probable pérdida de la función (LoF) en una sola categoría, ya que se sabe que las mutaciones LoF de un gen pueden tener mutaciones que se extienden a través de una amplia gama de la secuencia de la proteína. Las mutaciones incluyen variantes de alto impacto, tales como ganancia del codón de parada, cambio de marco, pérdida del codón inicial, y las mutaciones sitio de empalme. También se requiere que la profundidad de secuencia combinada para el tipo silvestre y el alelo mutante sea de al menos 5, para eliminar variantes de cobertura extremadamente bajas. Utilizando las llamadas variantes de 40 líneas celulares HNSCC que se secuenciaron, se evaluó el efecto de enriquecimiento de variantes LoF sobre la respuesta de PD del COMPUESTO A para cada gen. El factor de enriquecimiento se define como lo siguiente (es decir, relación de odds),

5

10

$$E(\text{LoF}) = \frac{P(\text{respondedor}|\text{mutante})[1 - P(\text{respondedor})]}{P(\text{respondedor})[1 - P(\text{respondedor}|\text{mutante})]}$$

Donde $P(\text{respondedor}|\text{mutante})$ representa la probabilidad de responder al tratamiento del COMPUESTO A dado que el gen albergue una mutación LoF, y $P(\text{respondedor})$ representa la probabilidad de responder al tratamiento con COMPUESTO A por casualidad.

Ejemplo 6: Notch1 es el biomarcador más predictivo para el tratamiento con un inhibidor de Wnt

15

Los genes candidatos fueron seleccionados en base a $E > 2$ y el número de ocurrencia LoF mayor que 3. Entre los principales candidatos, Notch1 LoF tiene uno de los factores de enriquecimiento más altos, 3 veces más que el enriquecimiento de selección aleatoria. Las mutaciones/variantes Notch1 fueron validadas por secuenciación de ADNc o ADN genómico de las líneas celulares de cáncer (GeneWiz). Las secuencias fueron analizadas utilizando Sequencher (GeneCodes).

20

De estos datos se puede concluir que una de las características más llamativas que correlacionan el estado de la mutación génica y las respuestas de inhibición de vías de líneas celulares para el COMPUESTO A fue la pérdida de la mutación de la pérdida de función Notch1 (LoF) en las líneas celulares sensibles.

25

Como se muestra en las Figuras 13A y 13B, cinco mutaciones de marco/sin sentido se han identificado entre las líneas celulares sensibles, con sólo una mutación sin sentido Notch1 entre las líneas celulares no sensibles. Curiosamente, todas las células con mutaciones Notch1 albergaban al menos un alelo mutante que afectó el extremo N-terminal de Notch1. Esto es consistente con la noción de que el extremo N de Notch1 se requiere para su función, con las repeticiones EGF de extremo N responsables de la interacción ligando-receptor 17, tal que las mutaciones en esta región son más propensas a ser mutaciones LoF. Para caracterizar adicionalmente la consecuencia funcional de las mutaciones de sentido erróneo, tales como Notch1 C478F, identificadas en las células HN30, un ensayo de gen reportero de Notch se realizó con la sobreexpresión de tipo silvestre o del mutante C478F (Figura 13C). La mutación C478F es situada en el dominio extracelular de Notch1, que es presumiblemente crítico para el receptor Notch y la interacción del ligando. De hecho, en la presencia del ligando de Notch DLL1, la actividad del C478F Notch1 mutante fue abolida en este ensayo del gen reportero Notch (Figura 13C).

30

35

Todos estos pueden proporcionar la orientación para la selección de pacientes en apoyo del tratamiento clínico de los inhibidores de PORCN tales como por ejemplo el COMPUESTO A.

40

La mutación sin sentido heterocigótica DTX3L (tipo Deltex 3, también denominado BBAP, proteína asociada a B-linfoma y BA) fue identificada en la línea celular HNSCC SNU1076. DTX3L es una ubiquitina ligasa E3. Su función celular en la vía de Notch de mamíferos no es clara, pero su Deltex homólogo de Drosophila es un regulador positivo de la señalización de Notch en Drosophila. En un modelo de xenoinjerto en ratones SNU1076, el compuesto A a la dosis de 5 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento del tumor (T/C: 25%) después de 14 días de tratamiento (Figura 14A). Por otra parte, el compuesto A inhibió sustancialmente la vía Wnt, como se indica por la reducción de 70% de AXIN2 (Figura 14B). Pérdida de DTX3L puede proporcionar un mecanismo alternativo para inactivar la vía de señalización Notch con la posterior activación de la señalización de Wnt.

Ejemplo 7: HRAS y FAT1 son marcadores predictivos para el tratamiento con un inhibidor de Wnt

45

De los esfuerzos de secuenciación del exoma y la perfilación de la línea celular, se observó un enriquecimiento de respondedores del compuesto A en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello mutantes de FAT1 (Figura 15). Por otra parte, a partir de nuestro análisis, 4 de 5 líneas de células que albergan mutaciones HRAS respondieron al compuesto A (figura 16).

50

Ejemplo 8: Predicción de la sensibilidad química de la línea celular a inhibidor de Wnt a partir de datos genómicos e implicaciones clínicas.

55

Como se determinó por secuenciación del exoma, la expresión génica de Notch1 (por ejemplo, estado de mutación) es uno de los más potentes indicadores de sensibilidad del inhibidor de Wnt, y por lo tanto puede ser utilizado como el biomarcador de estratificación ha ser considerado para la selección de pacientes con cáncer que responden a un inhibidor de Wnt, como por ejemplo el COMPUESTO A. La asociación de la mutación LoF Notch1 a la sensibilidad química del inhibidor de Wnt en un panel de líneas celulares relevantes al cáncer mostró que Notch1 es valiosa en la predicción de la sensibilidad del paciente a un inhibidor de Wnt. La mutación LoF Notch1 es para la predicción de la respuesta de inhibición de la vía basada en análisis bioinformáticos de 40 líneas celulares de cáncer de cuello y

cabeza (como se describe anteriormente). Además de Notch1 y basado en el modelo del tumor, SFRP2, FRZB, SFRP4 y DKK2 correlacionan también con la eficacia de un inhibidor de Wnt. Se espera aún mejor poder de predicción cuando un conjunto de al menos dos biomarcadores de los descritos en la presente, se utilizan para predecir la sensibilidad. Con la ayuda de la bioinformática, un grupo adicional adicional de biomarcadores útiles que pueden ser utilizados para la estratificación de pacientes se identificó - FAM58A, FLJ43860, NOTCH1, CDKN2A, OR7G3, CCDC168, ZNF527, HRAS y FAT1. A medida que la incidencia de la mutación LoF Notch1 es relativamente alta en los pacientes HNSCC, la expresión génica Notch1 es particularmente adecuada para seleccionar los pacientes HNSCC. La asociación de la mutación LoF NOTCH 1 a la sensibilidad química de los inhibidores de Wnt en un panel de líneas celulares de cáncer mostró que NOTCH1 tiene un valor predictivo de 3 veces enriquecimiento sobre la selección al azar. Otros biomarcadores antes mencionados también están asociados con modelos preclínicos que eran sensibles a un inhibidor de Wnt. Como una extrapolación para el entorno clínico, la selección de pacientes basándose en los biomarcadores antes mencionados aumentaría la probabilidad de respuesta clínica tras el tratamiento con un inhibidor de Wnt.

Referencias

1. Polakis, P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, doi:10.1101/cshperspect.a008052 (2012).
2. Nusse, R. & Varmus, H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *The EMBO journal* 31, 2670-2684, doi:10.1038/emboj.2012.146 (2012).
3. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205, doi:10.1016/j.cell.2012.05.012 (2012).
4. Seshagiri, S. et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature* 488, 660-664, doi:10.1038/nature11282 (2012).
5. Hao, H. X. et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485, 195-200, doi:10.1038/nature11019 (2012).
6. Koo, B. K. et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488, 665-669, doi:10.1038/nature11308 (2012).
7. Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. & Birchmeier, W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes & development* 22, 2308-2341, doi:10.1101/gad.1686208 (2008).
8. Aoki, K. & Taketo, M. M. Tissue-specific transgenic, conditional knockout and knock-in mice of genes in the canonical Wnt signaling pathway. *Methods Mol Biol* 468, 307-331, doi: 10.1007/978-1-59745-249-6_24 (2008).
9. Wang, Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics* 8, 2103-2109, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0282 (2009).
10. Herr, P., Hausmann, G. & Basler, K. WNT secretion and signalling in human disease. *Trends in molecular medicine* 18, 483-493, doi:10.1016/j.molmed.2012.06.008 (2012).
11. Takada, R. et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental cell* 11, 791-801, doi:10.1016/j.devcel.2006.10.003 (2006).
12. Biechele, S., Cox, B. J. & Rossant, J. Porcupine homolog is required for canonical Wnt signaling and gastrulation in mouse embryos. *Developmental biology* 355, 275-285, doi:10.1016/j.ydbio.2011.04.029 (2011).
13. Barrott, J. J., Cash, G. M., Smith, A. P., Barrow, J. R. & Murtaugh, L. C. Deletion of mouse Porcn blocks Wnt ligand secretion and reveals an ectodermal etiology of human focal dermal hypoplasia/Goltz syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12752-12757, doi: 10.1073/pnas.1006437108 (2011).
14. Wang, X. et al. Mutations in X-linked PORCN, a putative regulator of Wnt signaling, cause focal dermal hypoplasia. *Nature genetics* 39, 836-838, doi:10.1038/ng2057 (2007).
15. Grzeschik, K. H. et al. Deficiency of PORCN, a regulator of Wnt signaling, is associated with focal dermal hypoplasia. *Nature genetics* 39, 833-835, doi:10.1038/ng2052 (2007).
16. Leemans, C, Braakhuis, B., Brakenhoff, R., The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 11 (1), 9-22, doi: 10.1038/nrc.2010.12.16 (2011)
17. Kopan R (2012) Notch signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(10).

REIVINDICACIONES

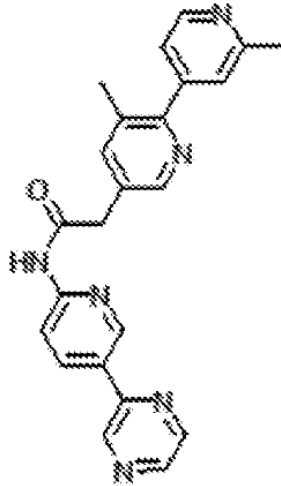
1. Un método para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de Wnt en una muestra mediante el uso de un inhibidor de Wnt denominado 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el método:
 - 5 a) medir la expresión génica diferencial de al menos el biomarcador Notch 1, en la muestra de cáncer obtenida del paciente; y
 - b) comparar la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador con la expresión génica de dicho biomarcador en una muestra control,
 - c) correlacionar la expresión reducida, o la actividad o función disminuida en comparación con el control con la sensibilidad del paciente al tratamiento con el inhibidor de Wnt denominado 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 2. Un inhibidor de Wnt denominado 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer con el inhibidor de Wnt que comprende:
 - 15 a) medir la expresión génica diferencial de al menos el biomarcador Notch-1, en la muestra de cáncer obtenida del paciente;
 - b) comparar la expresión génica diferencial del al menos un biomarcador con la expresión génica del biomarcador en una muestra de control;
 - c) determinar la sensibilidad del paciente al inhibidor de Wnt con base en la expresión reducida, o la actividad o función disminuida del al menos un biomarcador cuando se compara con el control; y
 - 20 d) administrar una cantidad efectiva del inhibidor de Wnt a un paciente que se ha determinado que es sensible al inhibidor de Wnt.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, o el inhibidor de Wnt para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el Notch1 tiene una mutación en el dominio extracelular.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, o el inhibidor de Wnt para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en donde la comparación de la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador con la expresión génica de una muestra de control indica una ruta Wnt funcional.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o el inhibidor de Wnt para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 5, o el inhibidor de Wnt para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el cáncer se trata con un inhibidor de Wnt y muestra expresión diferencial de Axin2, LEF1 y/o NKD1 en comparación con la expresión en una muestra de cáncer que es sensible a un inhibidor de Wnt.
- 35 7. Un inhibidor de Wnt denominado 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente, en donde el paciente de seleccionado sobre la base de:
 - a) medir la expresión génica diferencial de al menos el biomarcador Notch-1, en una muestra de cáncer obtenida del paciente;
 - 40 b) comparar la expresión génica diferencial del al menos un biomarcador con la expresión génica del biomarcador en una muestra de control;
 - c) determinar la sensibilidad del paciente al inhibidor de Wnt con base en la expresión reducida, o la actividad o función disminuida del al menos un biomarcador cuando se compara con el control; y
 - 45 d) seleccionar al paciente que es sensible al inhibidor de Wnt; y 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se debe administrar al paciente que se identifica como sensible o que probablemente responda al tratamiento con el inhibidor de Wnt.
8. Un inhibidor de Wnt denominado 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que tiene expresión génica diferencial de al menos biomarcador Notch-1 en comparación con una expresión génica de control, en donde la expresión génica diferencial se correlaciona con el paciente sensible al inhibidor de Wnt cuando la
- 50

expresión del al menos biomarcador Notch-1 se reduce, o su actividad o función disminuye cuando se compara con el control.

9. El inhibidor de Wnt para uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el Notch1 tiene una mutación en el dominio extracelular.
- 5 10. El inhibidor de Wnt para uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, preferiblemente la muestra de cáncer después del tratamiento con un inhibidor de Wnt está mostrando Axin2, LEF1 y/o expresión de NKD1 de una muestra de cáncer que es sensible a un inhibidor de Wnt.
- 10 11. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt denominado 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que muestra expresión génica diferencial de al menos biomarcador Notch-1 en comparación con una expresión génica de control, en donde la expresión génica diferencial se correlaciona con el paciente siendo sensible al inhibidor de Wnt cuando la expresión del al menos biomarcador Notch-1 se reduce, o su actividad o función disminuye cuando se compara con el control.
- 15 12. La composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el Notch1 tiene una mutación en el dominio extracelular.
13. La composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
- 20 14. Un inhibidor de Wnt denominado 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-N-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en donde el inhibidor de Wnt se administra a un paciente con cáncer que muestra expresión génica diferencial de al menos un biomarcador que es Notch-1 en comparación con una expresión génica de control, en donde la expresión génica diferencial se correlaciona con el paciente que es sensible al inhibidor de Wnt.

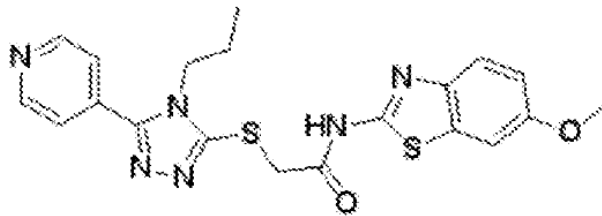
FIGURA 1

1A



COMPUESTO A

1B



COMPUESTO B

FIGURA 2

Figura 2A

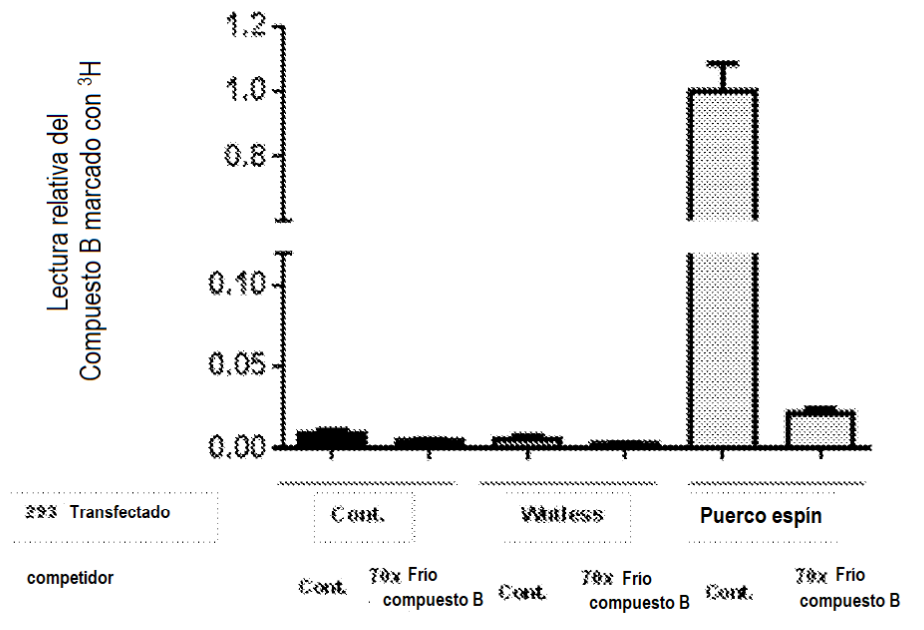


Figura 2b

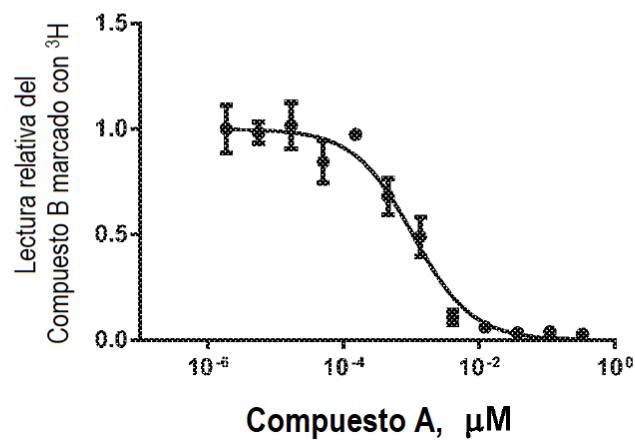


FIGURA 3

Figura 3A

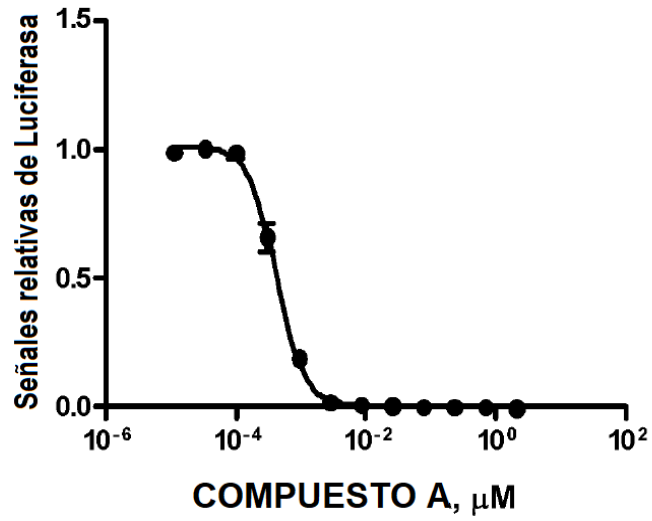


Figura 3B

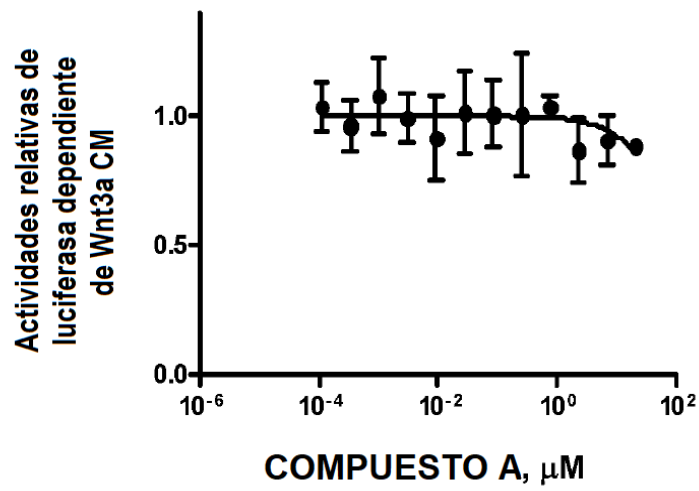


FIGURA 4



HA-Wnt3a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Comp. A (nM)	500	500	100	100	20	20	1	1	0.2	0.2	0	0
Sobrenadante												
Lisado												

FIGURA 5

Figura 5A

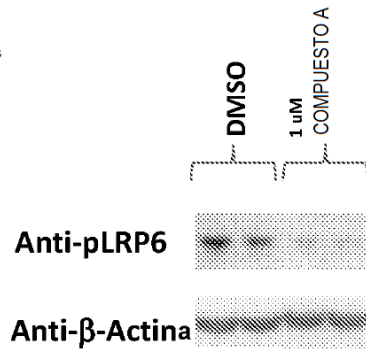


Figura 5B

WN10A_H	CHGT	GS	Q	L	K	T	C	W
WN10B_H	CHGT	GS	Q	F	K	T	C	W
WNT6_HU	CHGL	GS	C	A	L	R	T	C
WNT3_HU	CHGL	GS	E	V	K	T	C	W
WNT3A_H	CHGL	GS	E	V	K	T	C	W
WNT1_HU	CHGM	GS	C	T	V	R	T	C
WNT4_HU	CHGV	GS	E	V	K	T	C	W
WNT7A_H	CHGV	GS	C	T	F	K	T	C
WNT7B_H	CHGV	GS	C	T	F	K	T	C
WNT16_H	CHGV	GS	C	A	V	K	T	C
WNT2_HU	CHGV	GS	C	T	L	R	T	C
WNT2B_H	CHGV	GS	C	T	L	R	T	C
WNT5A_H	CHGV	GS	C	S	L	K	T	C
WNT5B_H	CHGV	GS	C	S	L	K	T	C
WNT8A_H	CHGI	GS	C	S	I	Q	T	C
WNT8B_H	CHGV	GS	C	T	P	Q	T	C
WNT11_H	CHGV	GS	C	S	I	R	T	C
WNT9A_H	CHGV	GS	C	T	V	R	T	C
WNT9B_H	CHGV	GS	C	A	V	R	T	C
	***	***				***		

Figura 5C

Ensayo	COMPUESTO A IC ₅₀ (nM)
Wnt1 (RGA)	1.1
Wnt2 (RGA)	0.2
Wnt3 (RGA)	0.6
Wnt3a (RGA)	0.9
Wnt6 (RGA)	0.2
Wnt7a (RGA)	2.4
Wnt9a (RGA)	0.05

FIGURA 6

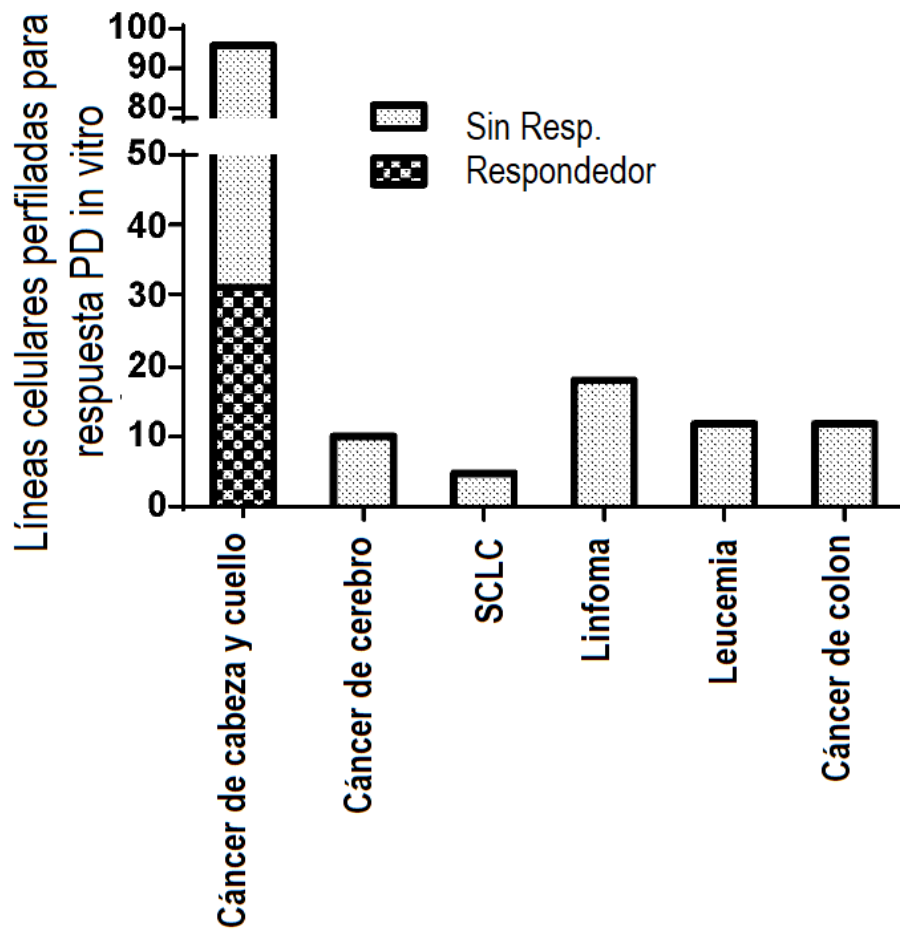


FIGURA 7

No	Nombres de líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello	Respuesta de reducción de Axin2	Inhibición de Axin2 (1-tratado/control)	No	Nombres de líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello	Respuesta de reducción de Axin2	Inhibición de Axin2 (1-tratado/control)
1	A-253	No	0	21	UMSCC 10A	Sí	0.5
2	CAL27	Sí	0.7	22	UMSCC 10B	No	0.3
3	Detroit 562	No	0.2	23	UMSCC 11A	Sí	0.6
4	FaDu	No	0	24	UMSCC 11B	Sí	0.6
5	HN30	Sí	0.9	25	UMSCC 12	No	0.4
6	Hs 840.T	No	0	26	UMSCC 13	Sí	0.9
7	SCC-4	No	0.4	27	UMSCC 14A	No	0.0
8	SCC-9	No	0	28	UMSCC 14B	Sí	0.5
9	SCC-25	No	0.1	29	UMSCC 14C	Sí	0.7
10	SNU-1066	No	0.3	30	UMSCC 16	No	0.3
11	SNU-1076	Sí	0.9	31	UMSCC 17A	No	0.3
12	UMSCC 1	Sí	0.9	32	UMSCC 17B	Sí	0.6
13	UMSCC 2	No	0.2	33	UMSCC 19	Sí	0.5
14	UMSCC 3	No	0.0	34	UMSCC 21A	No	0.1
15	UMSCC 4	No	0.3	35	UMSCC 22A	No	0.3
16	UMSCC 5	No	0.3	36	UMSCC 22B	No	0.0
17	UMSCC 6	Sí	0.9	37	UMSCC 23	No	0.3
18	UMSCC 7	No	0.4	38	UMSCC 25	Sí	0.9
19	UMSCC 8	No	0.4	39	UMSCC 26	No	0.3
20	UMSCC 9	Sí	0.8	40	UMSCC 28	Sí	0.7

FIGURA 7 - cont.

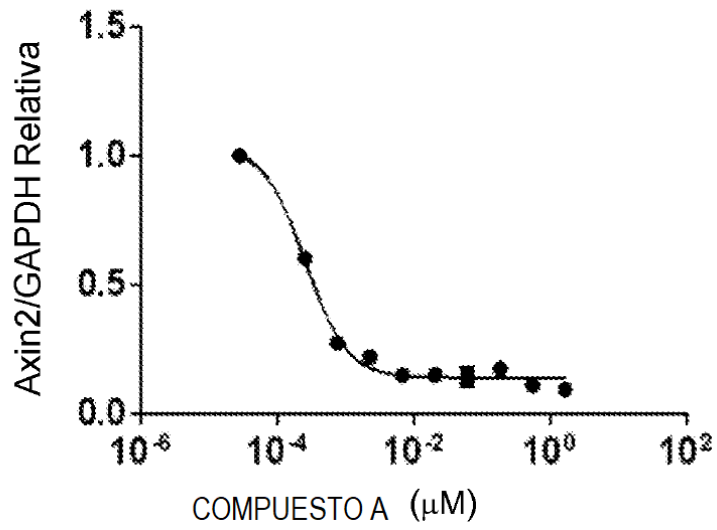
No	Nombres de líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello	Respuesta de reducción de Axin2	Inhibición de Axin2 (1-tratado/control)	No	Nombres de líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello	Respuesta de reducción de Axin2	Inhibición de Axin2 (1-tratado/control)
41	UMSCC 29	Sí	0.7	63	UMSCC 53	No	0.1
42	UMSCC 30	No	0.3	64	UMSCC 55	No	0.0
43	UMSCC 31	No	0	65	UMSCC 58	No	0.4
44	UMSCC 33	No	0.2	66	UMSCC 59	Sí	0.7
45	UMSCC 34	Sí	0.9	67	UMSCC 60	No	0.2
46	UMSCC 35	Sí	0.6	68	UMSCC 62	No	0.3
47	UMSCC 36	No	0.0	69	UMSCC 63	Sí	0.8
48	UMSCC 37	No	0.0	70	UMSCC 67	No	0.2
49	UMSCC 38	Sí	0.5	71	UMSCC 69	No	0.4
50	UMSCC 39	No	0.0	72	UMSCC 70	No	0.3
51	UMSCC 40	No	0.3	73	UMSCC 71	No	0.2
52	UMSCC 41	Sí	0.6	74	UMSCC 73B	No	0.4
53	UMSCC 42	No	0.3	75	UMSCC 74A	No	0.0
54	UMSCC 43	Sí	0.7	76	UMSCC 74B	No	0.0
55	UMSCC 44	No	0.0	77	UMSCC 76	Sí	0.7
56	UMSCC 45	Sí	0.5	78	UMSCC 77	No	0.2
57	UMSCC 46	Sí	0.5	79	UMSCC 78	No	0.0
58	UMSCC 47	No	0.3	80	UMSCC 80	No	0.0
59	UMSCC 49	No	0.2	81	UMSCC 81A	No	0.0
60	UMSCC 50	No	0.1	82	UMSCC 81B	No	0.3
61	UMSCC 51	No	0.4	83	UMSCC 83A	No	0.2
62	UMSCC 52	No	0.2	84	UMSCC 83B	No	0.4

FIGURA 7 - cont.

No	Nombres de líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello	Respuesta de reducción de Axin2	Inhibición de Axin2 (1-tratado/control)	No	Nombres de líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello	Respuesta de reducción de Axin2	Inhibición de Axin2 (1-tratado/control)
85	UMSCC 85	No	0.0	91	UMSCC 98	No	0.1
86	UMSCC 90	Sí	0.5	92	UMSCC 103	No	0.0
87	UMSCC 92	Sí	0.9	93	UMSCC 104	No	0.0
88	UMSCC 93	Sí	0.6	94	UMSCC 105	No	0.3
89	UMSCC 94	No	0.3	95	UMSCV 1A	No	0.0
90	UMSCC 97	Sí	0.8	96	UMSCV 6	No	0.1

FIGURA 8

8A



8B

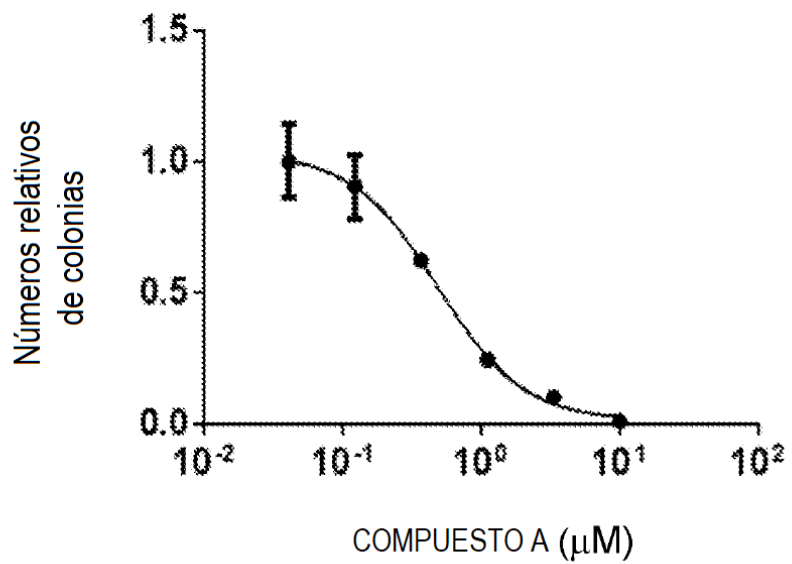
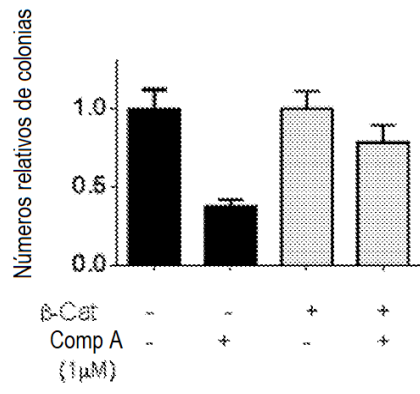
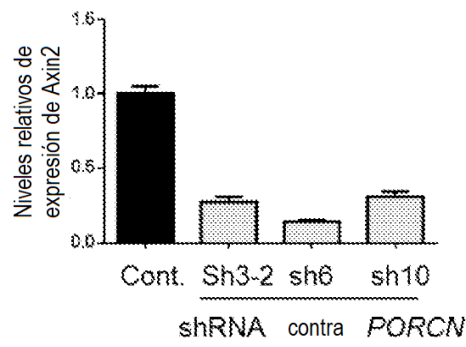


FIGURA 9

9A



9B



9C

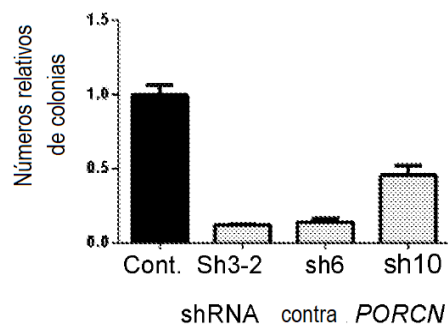
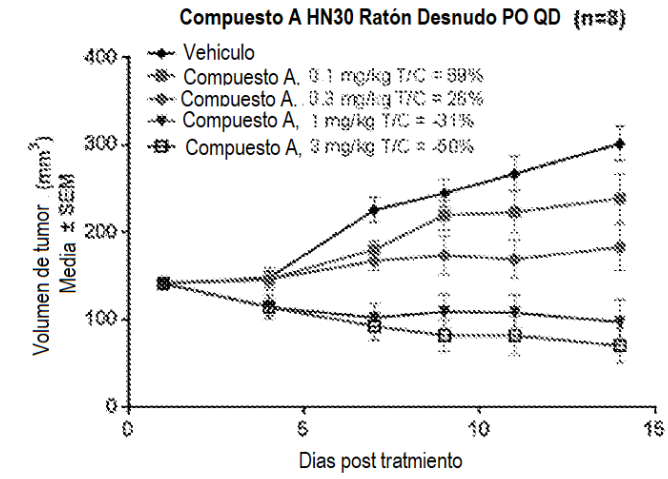
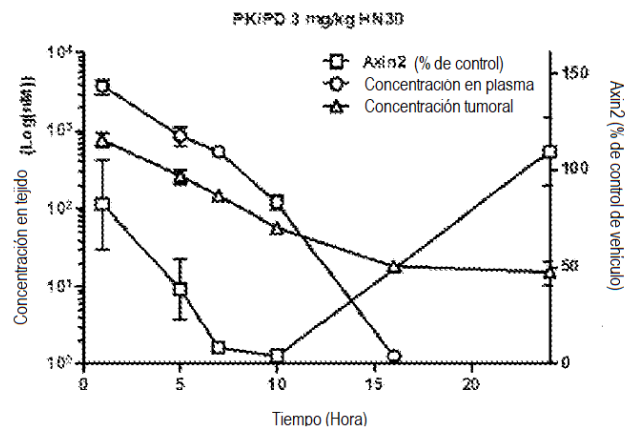


FIGURA 10

10A



10B



10C

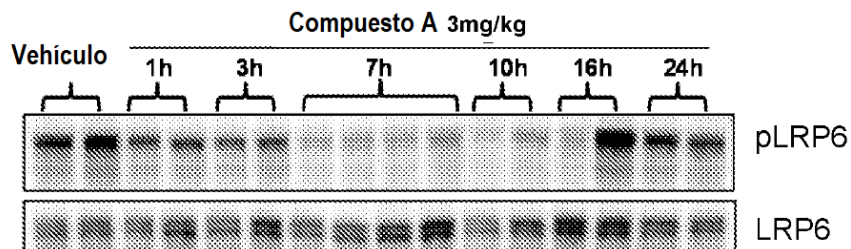


FIGURA 11

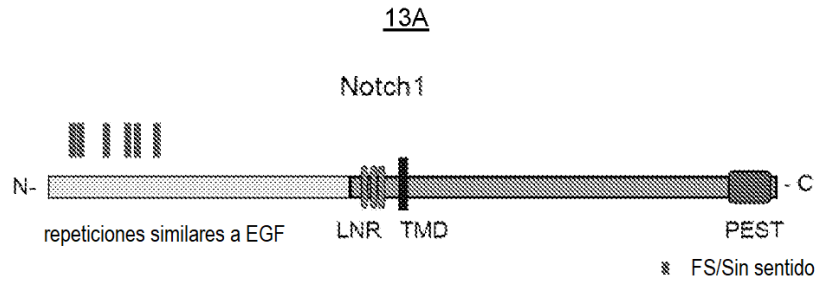
<u>Genes</u>	<u>Ocurrencia de mutacion</u>
<u>TP53</u>	<u>27/40 (68%)</u>
<u>CDKN2A</u>	<u>7/40 (18%)</u>
<u>Notch1</u>	<u>10/40 (25%)</u>
<u>PTEN</u>	<u>1/40 (3%)</u>
<u>HRAS</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>PIK3CA</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>Notch2</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>Notch3</u>	<u>2/40 (5%)</u>

FIGURA 12

Gen	Cambio genómico	Cambio de aminoácidos	Mutantes sensibles	Mutantes resistentes	Factor de enriquecimiento
FAM58A	g.chrX:152864477G>GC g.chrX:152858079GC>G g.chrX:152864513G>GC	A18fs, A181fs, A6fs	11	1	6.6
FLJ43860	g.chr8:142459777C>CA	L850fs	7	1	4.2
NOTCH1	g.chr9:139411813AC>A g.chr9:139411793TG>T g.chr9:139410488C>CT g.chr9:139417470C>A g.chr9:139412259CTGGCACGG>C g.chr9:139417398C>A	E488fs, G192X, E216X, K538fs, A495fs, P460fs,	5	1	3.0
OR7G3	g.chr19:9236916AG>A	A237fs	8	2	2.4
CCDC168	g.chr13:103386417C>A g.chr13:103384147C>T	E5544X, W6300X	4	1	2.4
ZNF527	g.chr19:37879852C>CTGTG g.chr19:37879854AT>A	P301fs, Y302fs	7	2	2.1
CDKN2A	g.chr9:21971123TGA>T g.chr9:21968242C>T g.chr9:21971186G>A g.chr9:21971028C>T g.chr9:21971120G>A	S78fs, W110X, R58X, R80X	4	0	NA

fs: desplazamiento del marco; X: mutaciones sin sentido

FIGURA 13



13B

Línea celular	Sensible a COMPUESTO A	Mutación de Notch1
UMSCC 25	Sí	E488fs
UMSCC 28	Sí	A495fs
UMSCC 29	Sí	K538fs
UMSCC 47	No	G192X
UMSCC 59	Sí	P460fs
UMSCC 76	Sí	E216X

13C

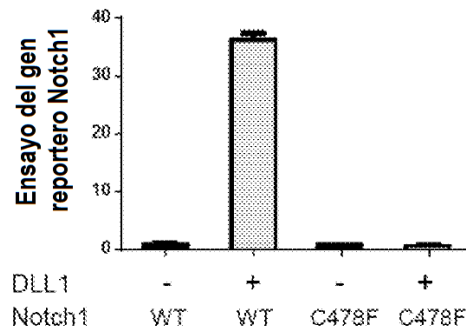
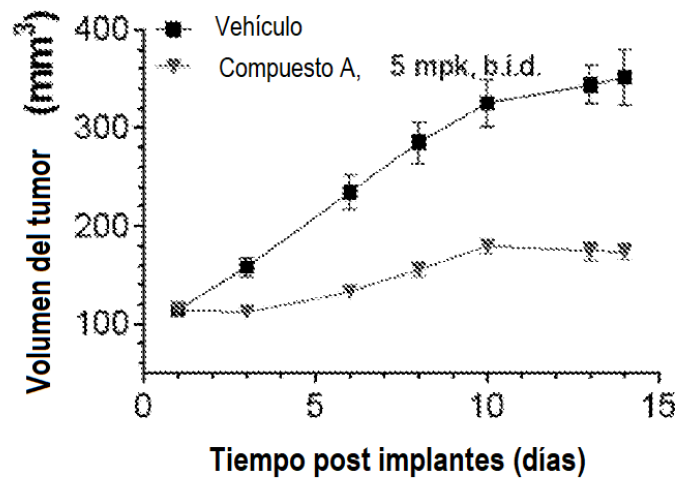


FIGURA 14

14A



14B

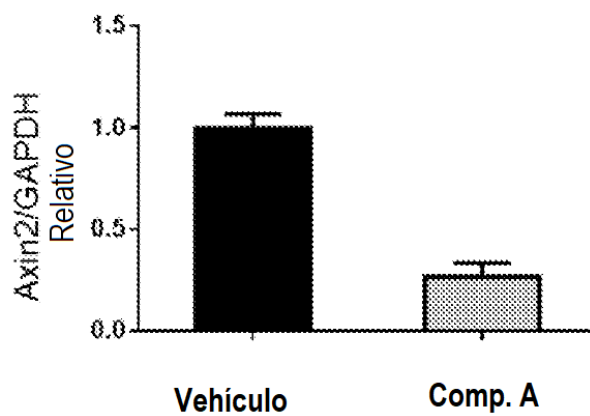


FIGURA 15

Línea celular	Sensible a COMPUESTO A	Mutación de FAT1
UMSCC 63	Sí	P2559S
UMSCC 11A	Sí	D4109G
UMSCC 41	Sí	G4147C
UMSCC 35	Sí	P2559L
UMSCC-25	Sí	N524fs
UMSCC-43	Sí	M1150fs
UMSCC 8	No	Q3887X

FIGURA 16

Línea celular	Sensible a COMPUESTO A	Mutación de HRAS
UMSCC 17B	Sí	Q61L
UMSCC 43	Sí	G12V
UMSCC 63	Sí	G13D
UMSCC 17A	Sí	Q61L
HN30	Sí	G12D