

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 208**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2014 PCT/JP2014/054846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2014 E 14756553 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2963114**

54 Título: **Método de predicción de la sensibilidad a un compuesto que inhibe la vía de transducción de señales de MAPK**

30 Prioridad:
27.02.2013 JP 2013036759

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2019

73 Titular/es:
**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi-Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-0023, JP**

72 Inventor/es:
KIGA, MASAKI

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 703 208 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

Método de predicción de la sensibilidad a un compuesto que inhibe la vía de transducción de señales de MAPK

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un método de predicción de la sensibilidad a un compuesto en el tratamiento de la enfermedad de cáncer que inhibe una vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (abreviada en lo sucesivo MAPK), a un método de selección de un paciente que tiene sensibilidad al compuesto, y a un compuesto para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad de cáncer. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de predicción de la sensibilidad a un compuesto en el tratamiento de la enfermedad de cáncer que inhibe una vía de señalización de MAPK, teniendo el método una característica en medir, usando una muestra biológica derivada de un paciente con cáncer, si la β -catenina contenida en la muestra biológica tiene o no al menos un tipo de mutación seleccionada del grupo que consiste en (i) una mutación activa y (ii) una mutación de sustitución de un resto de asparagina por un resto de serina en la posición 287, incluyendo el método determinar que un paciente que se detecta que tiene la mutación en β -catenina tiene sensibilidad al compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK. La presente invención también se refiere a un método de selección de un paciente que se somete al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK, teniendo el método la característica anteriormente mencionada.

TÉCNICA ANTERIOR

20 Una vía de señalización de MAPK es una vía de señalización común implicada en el crecimiento celular. La vía de señalización de MAPK es una cascada de proteínas cinasas compuesta de tres tipos de grupos de cinasa, es decir, MAPK, cinasa MAPK (abreviada en lo sucesivo MAPKK) y cinasa MAPKK (abreviada en lo sucesivo MAPKKK), y está altamente conservada en eucariotas. En mamíferos, MAPK se clasifican en cuatro tipos de moléculas de la familia MAPK, específicamente, las proteínas cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (denominadas en lo sucesivo ERK1/2), ERK5, cinasa del extremo N Jun/proteína cinasa activada por estrés (abreviada en lo sucesivo JNK/SAPK), y p38 MAPK, y se conoce que forman cascadas independientes entre sí. De las moléculas de la familia MAPK, ERK1/2 y ERK5 están cada una implicadas independientemente en una vía de señalización de MAPK que se activa principalmente por la estimulación con un factor de crecimiento o similar. La vía de señalización de MAPK en la que participan ERK1/2 se denomina algunas veces una vía de señalización canónica de MAPK. Por otra parte, JNK/SAPK y p38 MAPK están implicadas cada una independientemente en una vía de señalización de MAPK novedosa que se activa por una citocina inflamatoria tal como interleucina-1 (IL-1) o factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), o un estrés fisicoquímico tal como irradiación con luz UV o estimulación hipertónica.

35 En la vía de señalización canónica de MAPK, se promueven el crecimiento celular y la supervivencia por la fosforilación de proteínas aguas abajo por tres tipos de cinasas, es decir, Raf, cinasa MAPK/ERK (abreviada en lo sucesivo MEK) y ERK (Documento no de patente 1). Raf es una MAPKKK que tiene actividad de serina/treonina cinasa, y su familia incluye B-Raf (denominada algunas veces en lo sucesivo BRAF), Raf-1, A-Raf y similares. Raf se activa por Ras y opera la vía de señalización de MAPK. MEK es una MAPKK que tiene funciones de fosforilación no solo de un resto de tirosina, sino también de un resto de serina y un resto de treonina, y se activa por la fosforilación por Raf y fosforila específicamente ERK1/2. ERK es una MAPK que tiene actividad de serina/treonina cinasa. Se conoce que están presentes ERK1 y ERK2 que tienen homología extremadamente alta. ERK1/2 se fosforilan por MEK1 y MEK2 (denominadas en lo sucesivo MEK1/2).

40 En la vía de señalización canónica de MAPK, cuando un factor de crecimiento tal como el factor de crecimiento epidérmico (abreviado en lo sucesivo EGF) se une a un receptor que tiene actividad de tirosina cinasas sobre una membrana celular, una tirosina cinasa de receptor (abreviada algunas veces en lo sucesivo RTK) se dimeriza y activa (Documento no de patente 2). Cuando RTK se autofosforila, se une a la misma una proteína adaptadora Grb2. Grb2, a la que se une un factor de intercambio del nucleótido guanina, son of sevenless (SOS), promueve una reacción de intercambio de guanosina difosfato/guanosina trifosfato (abreviada en lo sucesivo GDP/GTP) de una proteína G, Ras (se conocen K-ras, H-ras, y N-ras) (Documento no de patente 3). Entonces, Ras se activa, que conduce a la activación de serina/treonina cinasa Raf. Raf fosforila directamente MEK1/2, y MEK1/2 fosforiladas fosforilan ERK1/2. Finalmente, ERK1/2 fosforiladas entran en el núcleo y activan la transcripción de Elk-1 o ciclina D1, dando como resultado el crecimiento celular.

50 Existen muchos informes sobre mutaciones y la expresión en exceso de factores implicados en la vía de señalización de MAPK en células tumorales. Se ha informado de la expresión en exceso y las mutaciones de la tirosina cinasa de receptor, tal como el receptor de EGF (abreviado en lo sucesivo EGFR) o Her2, que dan como resultado la activación anormal de la vía de señalización de MAPK que conduce a la transformación maligna (Documentos no de patente 4 a 6). En particular, la expresión en exceso y las mutaciones de EGFR se encuentran en 50 % o más de los tumores malignos humanos. Una mutación activa de Ras se encuentra en 30 % de todos los tumores malignos, y en particular, se encuentra en 90 % de cánceres pancreáticos y 50 % de cánceres colorrectales (Documentos no de patente 7 a 9). Similarmente, una mutación activa de BRAF se encuentra en 63 % de los melanomas malignos, 45 % de cánceres de tiroides y 36 % de cánceres de ovario (Documentos no de patente 10 a 12). Se produce una mutación activa de BRAF por activación constitutiva de una parte que tiene una acción catalítica

a través de su cambio estructural debido a una sustitución de un resto de valina a un resto de ácido glutámico (V600E) en un resto de aminoácido en la posición 600, que es una parte activa. Como resultado, se activa un factor aguas abajo sin la estimulación con un factor de crecimiento o similares y, por tanto, las células crecen anormalmente, conduciendo a transformación maligna (Documento no de patente 13).

- 5 MEK se sitúa aguas abajo de Ras y Raf y tiene especificidad por sustrato, y ERK como su sustrato se activa en muchos tipos de células tumorales. Por tanto, se ha desarrollado un inhibidor que se dirige a MEK con el fin de suprimir el crecimiento celular (Documento no de patente 14).

10 El inhibidor de MEK desarrollado por primera vez es PD098059 (Parke-Davis). Este compuesto presentó actividad inhibitoria sobre MEK con un valor de CI_{50} de aproximadamente 10 $\mu\text{mol/l}$. A continuación, se desarrolló U0126 (antiguamente, DuPont Pharma). U0126 presentó MEK1/2 con un valor de CI_{50} de desde aproximadamente 5 hasta 7 nmol/l . PD098059 y U0126 presentaron actividad supresora del crecimiento *in vitro*, pero no se sometieron a un ensayo clínico (Documentos no de patente 15 y 16).

15 Se informó por primera vez que el inhibidor de MEK PD184352 (CI-1040, Parke-Davis) presentaba un efecto supresor del crecimiento *in vivo* y se sometió a un ensayo clínico. Este compuesto mejoró en tanto la selectividad como la actividad inhibitoria en comparación con PD098059, e inhibió MEK1 en un modo competitivo no de adenosina trifosfato (ATP) con un valor de CI_{50} de 17 nmol/l . Además, en una etapa preclínica, se confirmaron las actividades inhibitorias del crecimiento celular sobre células de cáncer colorrectal y melanoma maligno (Documento no de patente 17). Se desarrollaron PD0325901 (Pfizer) y AZD6244 (AstraZeneca/Matriz BioPharma) como compuestos análogos de PD184352. PD0325901 presentó MEK1/2 en un modo competitivo no de ATP con un valor de CI_{50} de aproximadamente 1 nmol/l , y presentó actividad supresora del crecimiento más potente que PD184352 *in vivo* (Documento no de patente 18). En un ensayo clínico, se encontró un efecto antitumoral y una disminución en la fosforilación de ERK en un ensayo clínico de fase I y un ensayo clínico de fase II (Documentos no de patente 19 y 20). AZD6244 inhibe MEK en un modo competitivo no de ATP con un valor de CI_{50} de aproximadamente 12 nmol/l (Documento no de patente 21). Este compuesto presenta un efecto antitumoral en un ensayo clínico y está
25 actualmente en ensayo clínico.

Se ha encontrado que un inhibidor de MEK SMK-17 (Daiichi Sankyo Company, Limited.), que se desarrolló dirigido hacia la potente actividad inhibitoria de MEK y excelente farmacocinética, tiene actividad inhibitoria específica de MEK1/2 y actividad supresora del crecimiento (Documento no de patente 22 y Documento de patente 1).

30 Se conoce que otra vía de señalización, una vía de señalización de Wnt/ β -catenina, está implicada en el desarrollo del organismo, crecimiento celular y oncogénesis. En la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en un estado en el que no actúa un ligando Wnt, una proteína supresora de cáncer, coli de poliposis adenomatosa (APC), una proteína del armazón Axin (Documentos no de patente 23 a 25), glucógeno sintasa cinasa-3 (abreviada en lo sucesivo GSK-3) y caseína cinasa 1 (abreviada CK1) forman un complejo con β -catenina (abreviada algunas veces en lo sucesivo β -cat), en la que la β -catenina se fosforila por GSK-3 (Documento no de patente 23 y Documento no de patente 26) o CK1 (Documentos no de patente 27 a 29). La β -catenina fosforilada se degrada mediante una vía de ubiquitina-proteasoma (Documentos no de patente 30 a 32) y, por tanto, la β -catenina se suprime a un nivel de expresión más bajo. Sin embargo, cuando Wnt se une a un complejo de un receptor transmembranario Frizzled (abreviado en lo sucesivo Fz) y su receptor acoplado LRP (complejo Fz/LRP), se fosforila Dishevelled y se inhibe la actividad de fosforilación de GSK-3 mediante Axin (Documentos no de patente 33 y 34). Esta inhibe la fosforilación de β -catenina.
40 Como resultado, la β -catenina se almacena en el citoplasma sin ser degradada (Documento no de patente 35). Después de esto, la β -catenina entra en el núcleo y forma un complejo con un factor de transcripción, el factor de linfocitos T (abreviado en lo sucesivo TCF) (Documentos no de patente 36 y 37). Finalmente, se provoca la activación transcripcional de un gen diana tal como c-myc, que participa en el crecimiento celular, supervivencia y apoptosis, o ciclina D1, que promueve el crecimiento celular.

45 Se ha informado de mutaciones de APC y β -catenina en células tumorales, que son factores constituyentes de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Estas mutaciones se encuentran en 90 % de cánceres colorrectales (Documentos no de patente 38 y 39). Las mutaciones de APC son, en la mayoría de los casos, mutaciones deficientes en sitios de unión para Axin y β -catenina (Documento no de patente 40). Esto da como resultado que no se forma un complejo que fosforila β -catenina, y la β -catenina entra en el núcleo sin ser fosforilada y activa constitutivamente la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Las mutaciones activas entre las mutaciones de β -catenina son, en la mayoría de los casos, mutaciones de sustitución de restos de aminoácidos de un sitio de fosforilación por GSK-3, por ejemplo, un resto de serina en la posición 33 (S33), resto de serina en la posición 37 (S37) y resto de treonina en la posición 41 (T41) de la misma, y un resto de aminoácido de un sitio de fosforilación por CK1, por ejemplo, un resto de serina en la posición 45 (S45) de la misma, a un resto de aminoácido no fosforilado por GSK-3 o CK1. Esto da como resultado que la β -catenina que tiene una mutación activa entra en el
55 núcleo sin ser fosforilada por el complejo anteriormente mencionado y activa constitutivamente la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, dando como resultado la canceración de células (Documento no de patente 39).

Lista de referencias

Documentos de patente

[Documento de patente 1] WO 2004/083167

[Documento de patente 2] WO 2000/037141

5 [Documento de patente 3] WO 2002/006213

[Documento de patente 4] WO 2003/077914

[Documento de patente 5] WO 2007/014011

[Documento de patente 6] WO 2007/044515

[Documento de patente 7] WO 2006/011466

10 [Documento de patente 8] WO 2007/091736

[Documento de patente 9] WO 2005/121142

[Documento de patente 10] WO 2006/045514

[Documento de patente 11] WO 2010/059503

[Documento de patente 12] WO 2007/096259

15 Documentos no de patente

[Documento no de patente 1] Johnson, G.L. and R. Lapadat, Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 2002. 298(5600): p. 1911-2.

[Documento no de patente 2] Boonstra, J., et al., The epidermal growth factor. *Cell BiolInt*, 1995. 19(5): p. 413-30.

20 [Documento no de patente 3] Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 2000. 103(2): p. 211-25.

[Documento no de patente 4] Lynch, T.J., et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004. 350(21): p. 2129-39.

25 [Documento no de patente 5] Stephens, P., et al., Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*, 2004. 431(7008): p. 525-6.

[Documento no de patente 6] Hynes, N.E. and H.A. Lane, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(5): p. 341-54.

[Documento no de patente 7] Malumbres, M. and M. Barbacid, RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6): p. 459-65.

30 [Documento no de patente 8] Downward, J., Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(1): p. 11-22.

[Documento no de patente 9] Bos, J.L., et al., Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 1987. 327(6120): p. 293-7.

35 [Documento no de patente 10] Xing, M., BRAF mutation in thyroid cancer. *EndocrRelat Cancer*, 2005. 12(2): p. 245-62.

[Documento no de patente 11] Sieben, N.L., et al., In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol*, 2004. 202(3): p. 336-40.

[Documento no de patente 12] Brose, M.S., et al., BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, 2002. 62(23): p. 6997-7000.

40 [Documento no de patente 13] Sumimoto, H., et al., Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene*, 2004. 23(36): p. 6031-9.

[Documento no de patente 14] Hoshino, R., et al., Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*, 1999. 18(3): p. 813-22.

- [Documento no de patente 15] Alessi, D.R., et al., PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 1995. 270(46): p. 27489-94.
- [Documento no de patente 16] Favata, M.F., et al., Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, 1998. 273(29): p. 18623-32.
- 5 [Documento no de patente 17] Friday, B.B. and A.A. Adjei, Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(2): p. 342-6.
- [Documento no de patente 18] Sebolt-Leopold, J., The biological profile of PD 0325901: a second generation analog of CI-1040 with improved pharmaceutical potential. *AACR Meeting Abstracts*, 2004. 2004 (925).
- 10 [Documento no de patente 19] Lorusso, P., A phase 1-2 clinical study of a second generation oral MEK inhibitor, PD 0325901 in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 2005.23(3066).
- [Documento no de patente 20] Wang, D., et al., Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1773(8): p. 1248-55.
- 15 [Documento no de patente 21]Wallace, E., et al., Preclinical development of ARRY-142886, a potent and selective MEK inhibitor. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2004.45(A3891).
- [Documento no de patente 22] Kiga, M., et al., Antitumor effects of novel highly hydrophilic and non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitor, SMK-17. *Anticancer Drugs*, 2012. 23(1): p. 119-30.
- [Documento no de patente 23] Hart, M.J., et al., Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol*, 1998. 8(10): p. 573-81.
- 20 [Documento no de patente 24] Kishida, S., et al., Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem*, 1998. 273(18): p. 10823-6.
- [Documento no de patente 25] Ikeda, S., et al., Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J*, 1998. 17(5): p. 1371-84.
- 25 [Documento no de patente 26] Hinoi, T., et al., Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin. *J Biol Chem*, 2000. 275(44): p. 34399-406.
- [Documento no de patente 27] Amit, S., et al., Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev*, 2002. 16(9): p. 1066-76.
- 30 [Documento no de patente 28] Liu, C., et al., Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 2002. 108(6): p. 837-47.
- [Documento no de patente 29] Yanagawa, S., et al., Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J*, 2002. 21(7): p. 1733-42.
- 35 [Documento no de patente 30] Aberle, H., et al., beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 1997. 16(13): p. 3797-804.
- [Documento no de patente 31] Latres, E., D.S. Chiaur, and M. Pagano, The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene*, 1999. 18(4): p. 849-54.
- 40 [Documento no de patente 32] Liu, C., et al., beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999. 96(11): p. 6273-8.
- [Documento no de patente 33] Cliffe, A., F. Hamada, and M. Bienz, A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr Biol*, 2003. 13(11): p. 960-6.
- 45 [Documento no de patente 34] Tamai, K., et al., A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*, 2004. 13(1): p. 149-56.
- [Documento no de patente 35] Yamamoto, H., et al., Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J Biol Chem*, 1999. 274(16): p. 10681-4.
- [Documento no de patente 36] Behrens, J., et al., Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 1996. 382(6592): p. 638-42.

- [Documento no de patente 37] Molenaar, M., et al., XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 1996.86(3): p. 391-9.
- [Documento no de patente 38] Miyaki, M., et al., Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res*, 1994. 54(11): p. 3011-20.
- 5 [Documento no de patente 39] Morin, P.J., et al., Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 1997. 275(5307): p. 1787-90.
- [Documento no de patente 40] Lamlum, H., et al., The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med*, 1999. 5(9): p. 1071-5.
- 10 [Documento no de patente 41] Solit, D.B., et al., BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*, 2006. 439(7074): p. 358-62.
- [Documento no de patente 42] Dummer, R., et al., AZD6244 (ARRY-142886) vs temozolomide in patients with advanced melanoma: an open-label, randomized, multicenter, phase II study. *J. Clin. Oncol.*, 2008. 26(9033).
- [Documento no de patente 43] Infante, J.R., et al., Safety and efficacy results from the first-in-human study of the oral MEK 1/2 inhibitor GSK1120212. *J. Clin. Oncol.*, 2010. 28(2503).
- 15 [Documento no de patente 44] Sebolt-Leopold, J.S., et al., Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med*, 1999, 5(7): p. 810-6.
- [Documento no de patente 45] Takle, A.K., et al., The identification of potent and selective imidazole-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006. 16(2): p. 378-81.
- 20 [Documento no de patente 46] King, A.J., et al., Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. *Cancer Res*, 2006. 66(23): p. 11100-5.
- [Documento no de patente 47] Kerr, J.F., History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 2002. 181-182: p. 471-4.
- [Documento no de patente 48] Polakis, P., Wnt signal and cancer. *Genes Dev*, 2000. 14: p. 1837-51.
- 25 [Documento no de patente 49] Published genetic information database <http://www.sanger.ac.uk/>
- [Documento no de patente 50] Ilyas, M., et al., beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl AcadSci USA*, 1999. 94: p. 10330-4.
- [Documento no de patente 51] Sunaga, N., et al., Constitutive Activation of the Wnt Signaling Pathway by CTNNB1 (beta-Catenin) Mutations in a Subset of Human Lung Adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. 30: p. 316-21.
- 30 [Documento no de patente 52] Price, S., Putative allosteric MEK1 and MEK2 inhibitors. *Expert Opin Ther Patents*, 2008. 18(6): p. 603-27.
- [Documento no de patente 53] Trujillo, J.I., MEK inhibitors: a patent review 2008 - 2010. *Expert Opin Ther Patents*, 2011. 21(7): p. 1045-69.
- 35 [Documento no de patente 54] Sambrook J. et al. ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed.) 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [Documento no de patente 55] Ulmer, K.M., *Science*, 1983. 219: p. 666-671 [Documento no de patente 56] Ehrlich H.A. ed., *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. 1989 Stockton Press, New York
- 40 [Documento no de patente 57] Kohler and Milstein, *Nature*, 1975 256: p. 495
- [Documento no de patente 58] Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 1988 Cold Spring Harbor Press, New York
- [Documento no de patente 59] Goding, *Monoclonal Antibodies, Principles and Practice* (2d ed.) 1986 Academic Press, New York [Documento no de patente 60] Yamori, T., et al., Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an in vitro and in vivo human cancer cell line panel. *Cancer Res*, 1999. 59(16): p. 4042-9.
- 45 [Documento no de patente 61] Wilhelm, S., et al., Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(10): p. 835-44.

El documento US 2010/0209426 A1 desvela inhibidores de la represión inducida por progastrina de ICAT para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que presenta células secretoras de progastrina y células en las que la vía transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 es constitutivamente activa.

5 S.H. Jeon et al., "Axin Inhibits Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway by Ras Degradation via β -Catenin", *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), p. 14482 - 14492 (2007), enseñan que Axin inhibe al menos parcialmente la proliferación de células y sugieren que la vía de Ras-ERK desempeña una función en la carcinogénesis causada por mutaciones de los componentes de la vía de Wnt/ β -catenina.

10 C.M. Lovly et al., "Routine Multiplex Mutational Profiling of Melanomas Enables Enrollment in Genotype-Driven Therapeutic Trials", *PLoS ONE*, 7(4), p. e35309 (2012), informan del desarrollo, validación e implementación de un ensayo diseñado para detectar simultáneamente 43 mutaciones puntuales somáticas comunes en 6 genes (BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11 y CTNNB1) posiblemente relevantes para terapias dirigidas existentes y emergentes específicamente en melanoma.

15 E. Choy et al., "High-Throughput Genotyping in Osteosarcoma Identifies Multiple Mutations in Phosphoinositide-3-Kinase and Other Oncogenes", *Cancer*, 118(11), p. 2905 - 2914 (2011), informan de genes que mutan en osteosarcomas que ofrecen nuevos candidatos para el direccionamiento terapéutico.

SUMARIO DE LA INVENCION

PROBLEMA A RESOLVER POR LA INVENCION

20 En un campo terapéutico de una enfermedad de cáncer en los últimos años, se ha vuelto común el desarrollo de un fármaco molecularmente dirigido, y se ha establecido un concepto de selección de un paciente que recibe el efecto del fármaco con seguridad y administración del fármaco al paciente seleccionado. Por tanto, en el momento del desarrollo del fármaco molecularmente dirigido, existe una necesidad de desarrollo de un método de evaluación de un efecto del fármaco con el fin de la selección de pacientes o la reducción de efectos secundarios.

25 Por ejemplo, se ha informado que el inhibidor de MEK se puede considerar que presenta un efecto antitumoral sobre un tumor maligno que tiene una mutación activa de BRAF, que activa MEK, y, por tanto, se puede predecir la sensibilidad del tumor maligno al inhibidor de MEK por la detección de una mutación de BRAF V600E como la mutación activa (Documento no de patente 41). Sin embargo, las respuestas clínicas a inhibidores de MEK PD0325901 y AZD6244 de pacientes con melanoma maligno que tienen una mutación BRAF activa en un ensayo clínico son aproximadamente 10 % y 11 % en términos de un total de una respuesta parcial y una respuesta completa, respectivamente, y así no se ha obtenido un alto efecto (Documentos no de patente 42 y 43).

30 Es un objeto de la presente invención un método de predicción de la sensibilidad a un fármaco molecularmente dirigido, y un método de selección de un paciente que se determina que tiene alta sensibilidad al fármaco, para permitir el eficaz tratamiento de una enfermedad de cáncer con un fármaco molecularmente dirigido.

MEDIOS PARA RESOLVER EL OBJETO

35 Los inventores de la presente invención han hecho amplias investigaciones para lograr el objeto anteriormente mencionado, y han encontrado que cada uno de los inhibidores de MEK SMK-17 (Documento no de patente 22 y Documento de patente 1) y PD184352 (Documento no de patente 44), y un inhibidor selectivo de BRAF SB590885 (Documentos no de patente 45 y 46) induce la apoptosis selectivamente en células que tienen una mutación activa de β -catenina. Además, los inventores han encontrado que la inducción de la apoptosis por SMK-17 no se observó en células en las que se perdió una función de una vía de señalización de Wnt/ β -catenina por inactivación del gen β -catenina o expresión forzada de DN-TCF4, y que la apoptosis se indujo por SMK-17 en células en las que se activó una función de una vía de señalización de Wnt/ β -catenina por expresión forzada de β -catenina activa o estimulación de wnt3a. Además, los inventores han encontrado que SMK-17 presenta un efecto tumoral de regresión sobre un tumor que tiene una mutación activa de β -catenina *in vivo*. Así, la presente invención se ha llevado a cabo aclarando una relación entre la inducción de apoptosis de células tumorales por la inhibición de la vía de señalización de MAPK y su efecto de regresión tumoral, y la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina.

Es decir, la presente invención se refiere a lo siguiente:

[1] Un método de selección de un paciente para someterse al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (abreviada en lo sucesivo MAPK), que comprende:

50 usar una muestra biológica derivada de un paciente con cáncer, medir si la β -catenina contenida en la muestra biológica tiene o no al menos un tipo de mutación seleccionada del grupo que consiste en S33Y, S33C, S33F, S37F, S37P, T41A, S45del, S45F, S45P y N287S; y

seleccionar un paciente que se detecta que tiene la mutación en β -catenina como paciente para someterse al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK.

5 [2] Un método de predicción de la sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK, que comprende:

usar una muestra biológica derivada de un paciente con cáncer, medir si la β -catenina contenida en la muestra biológica tiene o no al menos un tipo de mutación seleccionada del grupo que consiste en S33Y, S33C, S33F, S37F, S37P, T41A, S45del, S45F, S45P y N287S; y

10 determinar que un paciente que se detecta que tiene la mutación en β -catenina tiene sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK.

[3] El método según [2], en el que la sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es la regresión del cáncer debido a la inducción de apoptosis en el tratamiento de la enfermedad de cáncer con el compuesto.

15 [4] El método según uno cualquiera de los puntos anteriormente mencionados [1] a [3], en el que la muestra biológica es una muestra biológica que contiene una célula cancerosa o un tejido canceroso.

20 [5] El método según uno cualquiera de [1] a [4], en el que el compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto que inhibe una MAPK cinasa cinasa (abreviada en lo sucesivo MAPKKK), un compuesto que inhibe una MAPK cinasa (abreviada en lo sucesivo MAPKK) y un compuesto que inhibe una MAPK.

[6] El método según el punto anteriormente mencionado [5], en el que el al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto que inhibe una MAPKKK, un compuesto que inhibe una MAPKK y un compuesto que inhibe una MAPK es al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto que inhibe B-Raf y un compuesto que inhibe MEK1/2.

25 [7] Un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad de cáncer, comprendiendo el método:

usar una muestra biológica derivada de un paciente con cáncer, medir si la β -catenina contenida en la muestra biológica tiene o no al menos un tipo de mutación seleccionada del grupo que consiste en S33Y, S33C, S33F, S37F, S37P, T41A, S45del, S45F, S45P y N287S;

30 seleccionar un paciente que se detecta que tiene la mutación en β -catenina como un paciente para someterse al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK; y

administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK al paciente seleccionado;

35 en el que el compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es SMK-17.

[8] El compuesto para su uso según el punto anteriormente mencionado [7], en el que la muestra biológica es una muestra biológica que contiene una célula cancerosa o un tejido canceroso.

VENTAJA DE LA INVENCION

40 El método según la presente invención permite la evaluación del efecto de un fármaco que contiene un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK en un paciente con cáncer antes de la administración del fármaco. Además, el método según la presente invención permite la selección de un paciente que se determina que tiene alta sensibilidad al fármaco, y permite un tratamiento eficaz de una enfermedad de cáncer con el fármaco. Además, el método según la presente invención se puede realizar *in vitro* usando una muestra biológica derivada de un paciente con cáncer y, por tanto, impone menos carga a un paciente. Como se ha descrito anteriormente, el método según la
45 presente invención es útil en el campo terapéutico de una enfermedad de cáncer.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

50 La FIG. 1 muestra los resultados de estudios sobre la actividad supresora del crecimiento de células tumorales de los inhibidores de MEK SMK-17 y U0126. Las líneas de células mutantes de β -catenina activa SW48, colo-205, colo-201, SK-MEL-1 y HCT_116 presentaron cada una alta sensibilidad a SMK-17 y U0126. Estas células tuvieron baja sensibilidad a un inhibidor de PI3K LY294002. El panel A y el panel B muestran los resultados de estudios en cultivo bidimensional (cultivo 2D) y cultivo tridimensional (cultivo 3D), respectivamente (Ejemplo 1).

La FIG. 2 muestra que la inducción de la apoptosis mediante tratamiento con SMK-17 se observó en líneas celulares que tenían mutaciones activas de β -catenina (representadas por "mutación de β -cat" en la FIG. 2). Específicamente, se observó un aumento en el número de células sub-G1 y la fragmentación de ADN, que indicaron la inducción de apoptosis, en las líneas celulares que tenían mutaciones activas de β -catenina, HCT_116, SW48, colo-201 y LS-174T, cuando las células se trataron con SMK-17 a una concentración tal que se inhibió completamente la fosforilación de ERK. Por otra parte, se observó un aumento sorprendente en el número de células detenidas en G1 en líneas celulares que tenían β -catenina no mutante (β -cat wt), A375 y HT29, pero no se observó un aumento sorprendente en el número de células sub-G1, que indicó que solo se indujo la inhibición del crecimiento. El panel superior muestra proteínas en las que las mutaciones se encontraron en las líneas celulares usadas, y la actividad transcripcional de TCF4 en las líneas celulares. El panel central muestra la actividad inhibitoria de la fosforilación de ERK de SMK-17. El panel inferior muestra los resultados de la detección de células sub-G1 con un citómetro de flujo (FCM) (Ejemplo 2).

La FIG. 3 muestra que los inhibidores de MEK SMK-17 y PD184352 y un inhibidor selectivo de BRAF SB590885 presentaron cada uno actividad inductora de la apoptosis en una línea celular que tenía una mutación activa de β -catenina, HCT_116 y/o SW48, a una concentración tal que se inhibió completamente la fosforilación de ERK. Por otra parte, estos inhibidores no indujeron la actividad inductora de la apoptosis en una línea celular que tenía β -catenina no mutante, A375, a una concentración tal que se inhibió completamente la fosforilación de ERK (Ejemplo 3).

La FIG. 4 muestra que la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 se suprimió significativamente en células en las que la β -catenina se inactivó por ARNip de β -catenina. El panel A muestra que la reducción de la expresión de β -catenina se confirmó 48 horas después de la inactivación. En el panel A, "cat" representa ARNip de β -catenina, y "ctl" representa ARNip de control. Se usó actina como patrón interno. El panel B muestra que la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 se suprimió significativamente en células en las que se inactivó la β -catenina en comparación con células tratadas con ARNip de control. En el panel B, "ip- β -catenina" representa ARNip de β -catenina, y "ip-control" representa ARNip de control (Ejemplo 4).

La FIG. 5 muestra que la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 se suprimió suprimiendo una vía de señalización de Wnt/ β -catenina por la expresión forzada de TCF4 negativo dominante (DN-TCF4). El panel A muestra que la actividad transcripcional de TCF4 se suprimió por la expresión forzada de DN-TCF4 en comparación con un control. La imagen izquierda del panel B muestra que el número de células sub-G1 aumentó mediante el tratamiento con SMK-17 en células de control, mientras que el aumento en el número de células sub-G1 por el tratamiento con SMK-17 observado en las células de control se suprimió en células con expresión forzada de DN-TCF4. La imagen derecha del panel B muestra que el número relativo de células sub-G1 fue significativamente reducido en las células con expresión forzada de DN-TCF4 en comparación con las células de control cuando las células se trataron con SMK-17 (Ejemplo 4).

La FIG. 6 muestra que la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 se observó estimulando una vía de señalización de Wnt/ β -catenina con un ligando de Wnt wnt3a. El panel A muestra que la actividad transcripcional de TCF4 aumentó por la estimulación de wnt3a en una línea celular que tenía β -catenina no mutante, A375. El panel B muestra que la escisión de poli(ADP-ribosa) polimerasa (abreviada en lo sucesivo PARP) se indujo mediante tratamiento con SMK-17 bajo condición de estimulación de wnt3a. El panel C muestra que el número de células sub-G1 aumentó significativamente en A375 mediante tratamiento con SMK-17 bajo condición de estimulación de wnt3a, pero no se observó aumento en el número de células sub-G1 bajo condición de estimulación no de wnt3a (Ejemplo 5).

La FIG. 7 muestra que la expresión forzada de β -catenina activa en una línea celular que tiene β -catenina no mutante, A375, produjo la observación de la inducción de apoptosis por SMK-17. En la FIG. 7, "ABC" representa beta-catenina activa (β -catenina activa). El panel A muestra que la actividad transcripcional de TCF4 aumentó en las células con expresión forzada de β -catenina activa. El panel B muestra que el número de células sub-G1 se redujo significativamente en las células con expresión forzada de β -catenina activa en comparación con las células de control (Ejemplo 5).

La FIG. 8 muestra que SMK-17 presentó un efecto de regresión tumoral *in vivo*. Se observó una disminución en el volumen del tumor (representado por "VT" en la FIG. 8) por la administración de SMK-17 en cada uno de los ratones sin pelo que llevaban líneas de células tumorales que tenían mutaciones de β -catenina activa, SW48 y colo205. Por otra parte, se observó un efecto supresor del crecimiento tumoral por la administración de SMK-17 en cada uno de los ratones sin pelo que llevan líneas celulares que tienen β -catenina no mutante, A375 y HT29, pero no se observó efecto de regresión tumoral (Ejemplo 6).

La FIG. 9 muestra que el número de células positivas para apoptosis aumentó por la administración de SMK-17 en un tejido tumoral de ratones sin pelo que portaban una línea de células tumorales que tiene una mutación activa de β -catenina, SW48. No se observó cambio en el número de células positivas para apoptosis por la administración de SMK-17 en un tejido tumoral en cada uno de los ratones sin pelo que portaban líneas celulares que tienen β -catenina no mutante, A375 y HT29. En la FIG. 9, " β -cat wt" representa β -catenina no mutante y "mutación de β -cat" representa una mutación activa de β -catenina. Las células positivas para

apoptosis se detectan por un ensayo de TUNEL, y su número se representa como el número de células positivas por TUNEL por campo (TUNEL positivo/campo) (Ejemplo 6).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un método de predicción de la sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK, teniendo el método una característica en que una mutación de β -catenina contenida en una muestra biológica derivada de un paciente con cáncer se detecta como un factor de sensibilidad para un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK. La presente invención también se refiere a un método de selección de un paciente que tiene sensibilidad a un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK, teniendo el método la característica anteriormente mencionada. La presente invención también se refiere a un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad de cáncer, incluyendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto al paciente seleccionado por el método anteriormente mencionado.

15 En el presente documento, la "sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK" se refiere a la sensibilidad o reactividad a un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK, y más específicamente, significa la inducción de apoptosis y la regresión del cáncer resultante de la misma en el tratamiento de la enfermedad de cáncer con el compuesto.

20 En el presente documento, la "apoptosis" se refiere a un término genérico para muertes celulares programadas (Documento no de patente 47). La apoptosis se refiere a muertes celulares controladas y reguladas, cuyas células que constituyen un cuerpo de un organismo multicelular provocan positivamente que un individuo se mantenga en un mejor estado. Se conoce como una característica de la apoptosis que la condensación nuclear y la posterior fragmentación de ADN ocurren después del cambio de una estructura de membrana celular, y las células se degradan en una estructura de pequeño tamaño denominado "cuerpo apoptótico". El contenido de ADN del cuerpo apoptótico es menor en comparación con el de las de células normales y las células en crecimiento. Por tanto, se puede detectar la apoptosis midiendo el contenido de ADN de células para detectar el cuerpo apoptótico. La formación de cuerpos apoptóticos se detecta como la fase sub-G1 en la medición de un ciclo celular. El ciclo celular se puede medir, por ejemplo, por un método bien conocido que utiliza un citómetro de flujo.

30 El "cáncer" significa generalmente un tumor maligno en sentido estricto, y se refiere a un tumor maligno de un origen de célula epitelial. Por otra parte, un tumor maligno no epitelial se denomina sarcoma. El "tumor maligno" se refiere particularmente a tumor histológico que tiene una alta propiedad de infiltración y que presenta tumor maligno tal como crecimiento y metástasis, en el que el tumor histológico se forma por crecimiento autónomo y excesivo de un tejido o células contrarias al control *in vivo*. Según la clasificación histopatológica, el cáncer se puede clasificar en tres tipos, es decir, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células transitorias. El adenocarcinoma es un cáncer derivado de tejido glandular, y ejemplos del mismo pueden incluir cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de duodeno, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y cáncer del cuerpo uterino. El carcinoma de células escamosas es un tumor formado por el crecimiento de células basales epiteliales malignamente transformadas con elevada atipia y polimorfía en un tejido conjuntivo subepitelial, y sus ejemplos pueden incluir cáncer de boca, cáncer de lengua, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer bronquial y cáncer de laringe. El carcinoma de células de transición es un cáncer derivado de un tejido epitelial de transición, y sus ejemplos pueden incluir cáncer de vejiga, cáncer de la pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer de boca. Mientras tanto, ejemplos del sarcoma incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma, rabdomioma, leiomioma, angiosarcoma y linfoma maligno.

45 La frecuencia del sarcoma en el tumor maligno es baja. Por tanto, el término "cáncer" se usa frecuentemente con el mismo significado que "tumor maligno". En el presente documento, el "cáncer" y el "tumor maligno" se usan intercambiablemente como sinónimos.

La mutación de β -catenina que va a detectarse como factor de sensibilidad para el compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es (i) una mutación activa y (ii) una mutación de sustitución de un resto de asparagina por un resto de serina en la posición 287 en la secuencia de aminoácidos de β -catenina como se define en las reivindicaciones adjuntas.

50 En el presente documento, la "mutación activa de β -catenina" se refiere a una mutación en β -catenina como se define en las reivindicaciones adjuntas que provoca un estado en el que la β -catenina funciona constitutivamente en células, es decir, una mutación que provoca un estado en el que la vía de señalización de Wnt/ β -catenina se activa constitutivamente.

55 Se ha informado de la mutación activa de β -catenina en muchos tipos de enfermedades de cáncer. Por ejemplo, se ha encontrado un tipo cualquiera o dos o más tipos de mutaciones de sustitución de S33, S37, T41 y S45 de β -catenina en cáncer colorrectal, cáncer del cuerpo uterino esporádico, tumor desmoide, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma, nefroblastoma (tumor de Wilms), meduloblastoma esporádico, carcinoma endometrioide de ovario, cáncer de próstata y cáncer de tiroides (Documento no de patente 48).

También se ha informado de la mutación activa de β -catenina en varias líneas de tumor maligno. Por ejemplo, existe un informe sobre una sustitución de T41 de β -catenina a alanina, y también hay informes sobre sustituciones de S33 a cisteína, fenilalanina y tirosina, y sustituciones de S37 y S45 a fenilalanina y prolina (Documento no de patente 49).

5 La secuencia de nucleótidos de una región codificante del gen de β -catenina no mutante se expone en SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias. Además, la secuencia de aminoácidos de β -catenina no mutante se expone en SEQ ID NO: 2. En el presente documento, cuando se menciona la posición de un cierto nucleótido en la secuencia de nucleótidos del gen de β -catenina, la posición se expresa como una posición en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1. En el presente documento, cuando se menciona la posición de un cierto resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de β -catenina, la posición se expresa como una posición en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

10 En el presente documento, se usa una abreviatura de una letra en la representación de una mutación en una secuencia de aminoácidos, y una sustitución de aminoácidos de un resto de aminoácido X a un resto de aminoácido Z en la posición y en una secuencia de aminoácidos se expresa algunas veces XyZ. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos de un resto de serina a un resto de tirosina en la posición 33 se expresa S33Y. Además, una delección de un resto de aminoácido X en la posición y se expresa Xydel. Por ejemplo, una delección de un resto de serina en la posición 45 se expresa S45del.

15 Además, en el presente documento, en el caso de representar una mutación en una secuencia de nucleótidos, el primer nucleótido de un codón de iniciación en la secuencia de nucleótidos se define como la posición 1, y una mutación de sustitución de una base N a una base M en la posición n se expresa algunas veces nN>M. Por ejemplo, una mutación de sustitución de citosina a adenina en la posición 98 se expresa 98C>A.

20 La Tabla 1 muestra ejemplos de la mutación activa y mutación N287S de β -catenina detectada en líneas de tumor maligno.

[Tabla 1]

Tipo de línea de células tumorales	Nombre de la línea de células tumorales	β -Catenina	
		Mutación aminoácido	de Mutación de gen
Cáncer colorrectal	SW48	S33Y	98C>A
	HCT_116	S45del	Delección en el marco de tres nucleótidos
	LS174-T	S45F	134C>T
	Colo201	N287S	860A>G
	Colo205	N287S	860A>G
Cáncer de piel	SK-MEL-1	S33C	98C>G
Cáncer de pulmón	SW1573	S33F	98C>T
	A427	T41A	121A>G
Cáncer de duodeno	HUTU-80	S37F	110C>T
Adenocarcinoma de ovario productor de hCG	RTSG	S37P	109T>C
Cáncer de la corteza suprarrenal	NCI-H295	S45P	133T>C

25 Como mutación activa de β -catenina, se ha informado de mutaciones de S33Y, S45del y S45F en líneas de células de cáncer colorrectal, células SW48, células HCT_116 y células LS-174T, respectivamente. Además, se ha informado de una mutación de S33C en una línea de células de cáncer de piel, células SK-MEL-1. Como se muestra en los ejemplos descritos después, estas líneas celulares presentaron alta sensibilidad al tratamiento con un inhibidor de MEK o inhibidor de BRAF, que era un compuesto que inhibió una vía de señalización de MAPK, en comparación con las células que tienen β -catenina no mutante, y se indujo su apoptosis.

30 Además de lo anterior, existen informes sobre la mutación activa de β -catenina, que es una mutación tal como: S33F y T41A en líneas de células de cáncer de pulmón, células SW1573 y células A427, respectivamente; S37F en una línea de células de cáncer de duodeno, células HUTU-80; S37P en una línea de células de adenocarcinoma de

ovario productor de hCG, células RTSG; y S45P en una línea de células de cáncer de la corteza suprarrenal, células NCI-H295 (Documentos no de patente 50 y 51).

Por otra parte, no se ha informado que una mutación de sustitución de un resto de asparagina por un resto de serina en la posición 287 (N287S) sea una mutación activa de β -catenina. Sin embargo, como se muestra en los ejemplos descritos después, se indujo la apoptosis por tratamiento con inhibidor de MEK en líneas de células de cáncer colorrectal que tenían la mutación de sustitución anteriormente mencionada, células colo201 y células colo205 (Documento no de patente 51), como con células que tenían mutaciones activas de β -catenina. Este hecho indica que la mutación N287S se puede utilizar como un factor de sensibilidad para el compuesto que inhibe la vía de señalización de MAPK.

La detección de la mutación de β -catenina se puede realizar detectando una mutación del gen de β -catenina. La detección de la mutación del gen de β -catenina se realiza preferentemente detectando la presencia o ausencia de una mutación de aminoácido para codones que codifican un tipo cualquier o dos o más tipos de restos de aminoácidos en la posición 33, posición 37, posición 41, posición 45 y posición 287 en la secuencia de aminoácidos de β -catenina. La "mutación de aminoácido" significa una sustitución de un único par de bases que cambia un código genético de manera que dispone un aminoácido diferente de un aminoácido normal en un sitio de interés. Cuando se detecta una diferencia en el nucleótido en una comparación entre la secuencia de nucleótidos del gen de β -catenina en una muestra de prueba y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) del gen de β -catenina no mutante, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación.

Más ejemplos preferidos de la mutación del gen de β -catenina pueden incluir mutaciones de citosina en la posición 98, timina en la posición 109, citosina en la posición 110, adenina en la posición 121, timina en la posición 133, citosina en la posición 134 y adenina en la posición 860 en el gen de β -catenina, y ejemplos incluso más preferidos pueden incluir las mutaciones de genes mostradas en la Tabla 1.

La detección de la mutación del gen de β -catenina se puede realizar usando un método en sí conocido. Por ejemplo, se amplifica un ácido nucleico de una longitud completa o fragmento que incluye un sitio de mutación que va a detectarse del gen y se determina una secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado por una tecnología bien conocida. La amplificación del ácido nucleico se puede realizar por un método de amplificación de ácidos nucleicos en sí conocido, tal como una reacción en cadena de la polimerasa (abreviada PCR). Se determina una secuencia de nucleótidos del producto amplificado resultante, por ejemplo, por un método de secuenciación de ADN tal como un método de secuenciación directa. Dicho método de detección de mutaciones se puede realizar con referencia a los métodos descritos en los documentos (por ejemplo, Documentos no de patente 50 y 51). Como método de determinación de secuencias, se puede utilizar un método de hibridación, un método de análisis de polimorfismos de longitud de fragmento por enzima de restricción (RFLP) y similares, además del método de secuenciación. Cuando el gen de β -catenina amplificado de una muestra de prueba no es idéntico a uno no mutante, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación. Además, se puede utilizar un método de análisis de mutaciones de un solo nucleótido conocido. Por ejemplo, cuando se realiza la PCR, la detección de la mutación del gen de β -catenina se puede realizar usando un cebador que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos parcial consecutiva que contiene un sitio de mutación como cebador, para detectar la presencia o ausencia de un producto amplificado. Cuando el gen de β -catenina en la muestra de prueba se amplifica usando dicho cebador, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación de interés. Cuando no se amplifica el gen de β -catenina en la muestra de prueba, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba no tiene mutación capaz de ser detectada con el cebador. En el método de hibridación, se amplifica un ácido nucleico de un gen que va a detectarse, se pone en contacto una sonda de hibridación con el ácido nucleico, y se detecta la presencia o ausencia de la hibridación entre la sonda de hibridación y el ácido nucleico. La "sonda de hibridación" se refiere a un polinucleótido que puede distinguir entre dos tipos de ácidos nucleicos de una manera detectable. Como sonda de hibridación, se usa un fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de una región que contiene una mutación que va a detectarse. La detección de la hibridación se puede realizar por una tecnología bien conocida. Cuando la sonda se hibrida con el ácido nucleico del gen de β -catenina en la muestra de prueba, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación.

La detección de la mutación de β -catenina también se puede realizar detectando una mutación de un aminoácido de la misma. La mutación del aminoácido de β -catenina se puede detectar por una técnica inmunológica usando un anticuerpo que se une específicamente a una β -catenina mutante. El anticuerpo que se une específicamente a una β -catenina mutante significa un anticuerpo que se une más selectivamente a una β -catenina mutante que va a detectarse en comparación con una β -catenina mutante distinta de la β -catenina mutante que va a detectarse, β -catenina no mutante, y una proteína distinta de β -catenina. Ejemplos de la técnica inmunológica incluyen un método de radioinmunoensayo (método RIA), un método de enzimoimmunoanálisis de adsorción (método ELISA), transferencia Western, tinción inmunohistológica y análisis de citometría de flujo. Se puede producir un anticuerpo deseado por el método de producción general existente usando como inmunogén un oligopéptido que comprende una β -catenina mutante, preferentemente una secuencia de aminoácidos parcial de una β -catenina mutante que corresponde a una región parcial que contiene un resto de aminoácido en la posición donde está presente la mutación. Alternativamente, también se puede usar un anticuerpo comercialmente disponible deseado.

La detección de la mutación, en particular, la mutación activa de β -catenina, también se puede realizar detectando una reacción que se provoca por la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, por ejemplo, la potenciación de la actividad transcripcional de TCF o la acumulación intranuclear de β -catenina, debido a que la mutación activa activa la vía de señalización. Se conoce en sí un método de detección de la actividad transcripcional de TCF y se puede realizar, por ejemplo, por un ensayo indicador TOPFLASH usado en los ejemplos descritos después. Se puede realizar un método de detección de la acumulación intranuclear de β -catenina por una tecnología bien conocida que se refiere a la detección de una proteína intranuclear, por ejemplo, un método de evaluación basado en inmunotinción. Cuando se observa un aumento en la actividad transcripcional de TCF o la acumulación intranuclear de β -catenina en una muestra de prueba, se puede determinar que la β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación activa.

En el presente documento, la "muestra biológica" se refiere a un tejido, un líquido y células aisladas de un individuo y una mezcla de los mismos. Ejemplos de los mismos pueden incluir, pero no se limitan a, una biopsia de tumor, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido intraperitoneal, líquido linfático, una sección de piel, sangre, orina, heces, flema, un órgano respiratorio, un tubo digestivo, una vía genitourinaria, saliva, leche y un órgano digestivo, y células recogidas del mismo. La "muestra biológica" es preferentemente una muestra que contiene células cancerosas, y se ejemplifica más preferentemente por un tejido o células obtenidas por escisión o biopsia, o células derivadas de líquido pleural o líquido intraperitoneal. La muestra biológica es todavía más preferentemente una muestra que contiene células cancerosas o un tejido canceroso.

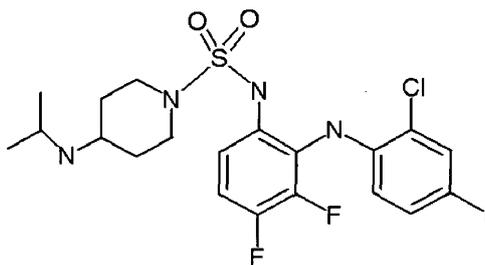
En el presente documento, el "compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK" se refiere a un compuesto que reduce una función de la vía de señalización de MAPK. El compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK engloba un compuesto que reduce una función de un elemento constituyente, tal como una proteína que constituye la vía de señalización de MAPK, y un compuesto que reduce una función de la vía de señalización de MAPK, por ejemplo, una función de promoción de la supervivencia y el crecimiento de células. A este respecto, un compuesto que reduce una función de una diana sobre la que actúa el compuesto se denomina algunas veces "inhibidor".

La vía de señalización de MAPK se clasifica en una activada por estimulación con un factor de crecimiento o similares, y una activada por una citocina inflamatoria o un estrés fisicoquímico. En el presente documento, el "compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK" es preferentemente un "compuesto que inhibe una vía de señalización canónica de MAPK" que se activa por la estimulación con un factor de crecimiento o similares.

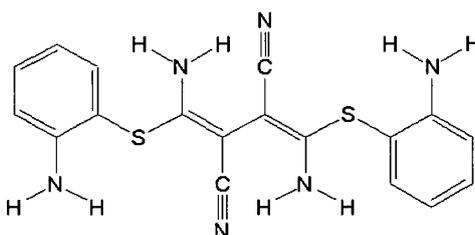
El compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es preferentemente un compuesto que inhibe la vía aguas arriba de MEK en la vía de señalización, y puede ser al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto que inhibe una MAPKKK, un compuesto que inhibe una MAPKK y un compuesto que inhibe una MAPK. El compuesto que inhibe una MAPKKK es preferentemente un compuesto que inhibe Raf, más preferentemente un compuesto que inhibe BRAF. El compuesto que inhibe una MAPKK es preferentemente un compuesto que inhibe una MEK, más preferentemente un compuesto que inhibe MEK1/2. El compuesto que inhibe una MAPK es preferentemente un compuesto que inhibe una ERK, más preferentemente un compuesto que inhibe ERK1/2. Es decir, el compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es más preferentemente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto que inhibe BRAF y un compuesto que inhibe MEK1/2, todavía más preferentemente un compuesto que inhibe MEK1/2.

Ejemplos del compuesto que inhibe una MEK pueden incluir un compuesto desvelado en el documento WO 2000/037141 (Documento de patente 2) (tal como PD-184352), un compuesto desvelado en el documento WO 2002/006213 (Documento de patente 3) (tal como PD-0325901), un compuesto desvelado en el documento WO 2003/077914 (Documento de patente 4) (tal como selumetinib), un compuesto desvelado en el documento WO 2007/014011 (Documento de patente 5) (tal como refametinib), un compuesto desvelado en el documento WO 2007/044515 (Documento de patente 6) (tal como GDC-0973, es decir, XL-518), un compuesto desvelado en el documento WO 2006/011466 (Documento de patente 7) (tal como RO-4987655), un compuesto desvelado en WO2007/091736A1 (Documento de patente 8) (tal como RO-5126766), un compuesto desvelado en el documento WO 2005/121142 (Documento de patente 9) (tal como GSK-1120212, es decir, trametinib), un compuesto desvelado en el documento WO 2006/045514 (Documento de patente 10) (tal como AS-703026), un compuesto desvelado en el documento WO 2010/059503 (Documento de patente 11) (tal como TAK-733), un compuesto desvelado en el documento WO 2007/096259 (Documento de patente 12) (tal como RO-5068760), un compuesto desvelado en Expert Opin Ther Patents, 2008. 18(6): p. 603-27. (Documento no de patente 52), y un compuesto desvelado en Expert Opin Ther Patents, 2011. 21(7): p. 1045-69. (Documento no de patente 53), así como un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural 1, un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural 2 y un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural 3. El compuesto representado por la siguiente fórmula estructural 1 es un inhibidor selectivo de MEK1/2, y se denomina SMK-17 (Daiichi Sankyo Company, Limited). El compuesto representado por la siguiente fórmula estructural 2 se denomina U0126 (Sigma). El compuesto representado por la siguiente fórmula estructural 3 presenta actividad inhibitoria para MAPK, además de MEK, y se denomina PD184352.

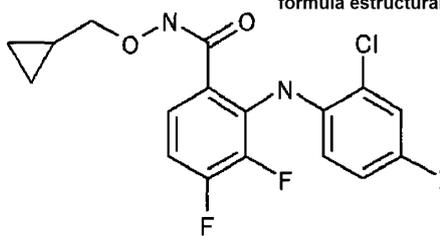
fórmula estructural 1



fórmula estructural 2

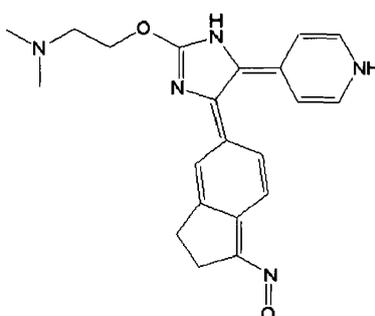


fórmula estructural 3



5 El compuesto que inhibe BRAF se puede ejemplificar por un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural 4. El compuesto es un inhibidor selectivo de BRAF denominado SB590885.

fórmula estructural 4



10 Una enfermedad de cáncer a la que es aplicable el método según la presente invención puede ser una enfermedad de cáncer en la que se detectan células tumorales que tienen una vía de señalización de Wnt/ β -catenina activada, y es particularmente preferentemente una enfermedad de cáncer en la que se detectan células tumorales que tienen β -catenina activada. Ejemplos de dicha enfermedad de cáncer pueden incluir una enfermedad de cáncer en la que se detectan células tumorales que tienen una mutación activa de β -catenina, y una enfermedad de cáncer en la que se detectan células tumorales que tienen una mutación de sustitución N287S. La mutación activa de β -catenina o la mutación de sustitución N287S se detectan en una amplia variedad de tejidos cancerosos y líneas de células tumorales malignas. Ejemplos específicos de la enfermedad de cáncer a la que es aplicable el método según la presente invención pueden incluir cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de duodeno, cáncer de ovario, cáncer del cuerpo uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de vesícula biliar, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de boca, cáncer de lengua, cáncer de faringe, cáncer de esófago, cáncer bronquial, cáncer de laringe, cáncer de vejiga, cáncer de la pelvis renal y cáncer de uréter. De ellos, se prefieren cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de duodeno, cáncer de ovario y cáncer del cuerpo uterino.

En un paciente con cáncer seleccionado por tener sensibilidad al tratamiento para el cáncer con el compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK por el método según la presente invención, se puede considerar que la

administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK induce apoptosis en un tumor, dando como resultado regresión tumoral.

El compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK se administra a un paciente con cáncer por sí mismo o como una composición que contiene el compuesto. La composición se produce como una composición farmacéutica que contiene, además del principio activo, un tipo o dos o más tipos de vehículos farmacéuticos tales como una carga, un expansor, un aglutinante, un agente humectante, un disgregante, un tensioactivo, un lubricante, un diluyente y un excipiente para ser generalmente usado dependiendo de las formas de uso de una preparación. La cantidad del principio activo contenida en la composición farmacéutica se selecciona apropiadamente de un amplio intervalo, y es apropiado que la cantidad se establezca para entrar dentro de un intervalo de generalmente desde aproximadamente 0,00001 hasta 70 % en peso, preferentemente desde aproximadamente 0,0001 hasta 5 % en peso.

No está particularmente limitado un intervalo de dosis y se selecciona apropiadamente dependiendo de, por ejemplo, la eficacia de un componente que se va a contener, una forma farmacéutica, una vía de administración, el tipo de una enfermedad, las propiedades de un sujeto (por ejemplo, peso corporal, edad, afecciones médicas, y la presencia o ausencia de uso de otros productos farmacéuticos), y el criterio del médico de guardia. En general, una dosis apropiada entra dentro de, por ejemplo, un intervalo de desde aproximadamente 0,01 μg hasta aproximadamente 100 mg, preferentemente desde aproximadamente 0,1 μg hasta aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal de un sujeto. Sin embargo, estas dosis se pueden cambiar usando un experimento rutinario general para la optimización bien conocida en la técnica. La dosis se puede dividir de manera que la administración se pueda realizar de una vez a varias veces al día. Alternativamente, la administración se puede realizar intermitentemente a una frecuencia de una vez cada varios días o varias semanas.

Como vía de administración, se puede seleccionar cualquiera de administración sistémica y administración local. En este caso, se selecciona una vía de administración apropiada dependiendo de, por ejemplo, las enfermedades y los síntomas. Por ejemplo, como vía parenteral, se administran administración subcutánea, administración intradérmica y administración intramuscular, además de administración intravenosa general y administración intrarterial. Alternativamente, se puede adoptar la administración por vía oral como la vía de administración. Además, se puede realizar administración transmucosa o administración transdérmica. Además, se puede adoptar administración intratumoral directa.

Se pueden seleccionar diversas formas como la forma farmacéutica dependiendo de los fines. Ejemplos típicos de las mismas incluyen: una forma farmacéutica sólida tal como un comprimido, una píldora, un polvo, una preparación en polvo, un gránulo fino, un gránulo o una cápsula; y una forma farmacéutica líquida tal como una preparación en disolución acuosa, una preparación en disolución de etanol, una suspensión, una emulsión de grasa, una preparación de liposoma, un clatrato tal como ciclodextrina, un jarabe, o un elixir. Dependiendo de las vías de administración, las formas farmacéuticas se clasifican además en una preparación oral, una preparación parenteral (una infusión o una inyección), una preparación transnasal, un inhalante, una preparación transvaginal, un supositorio, una preparación sublingual, colirios, gotas para los oídos, un bálsamo, una crema, una preparación para absorción transdérmica, una preparación para absorción transmucosa, y similares, y cada una se puede combinar, formar y preparar según métodos generales.

Un reactivo que se puede usar en el método de predicción anteriormente mencionado según la presente invención es un reactivo para detectar una cualquiera de las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en (i) una mutación activa de β -catenina como se define en las reivindicaciones adjuntas y (ii) una mutación de sustitución de un resto de ácido aspártico a un resto de serina en la posición 287 en una secuencia de aminoácidos de β -catenina.

Un ejemplo más específico del reactivo es un cebador de oligonucleótidos o sonda de oligonucleótidos que se puede usar en el método de detección de la mutación del gen de β -catenina. Otro ejemplo del reactivo puede ser un anticuerpo que se puede usar en el método de detección de la mutación de aminoácido de β -catenina.

El cebador de oligonucleótidos puede ser cualquier cebador de oligonucleótidos específico diseñado para permitir la amplificación específica de la secuencia de nucleótidos de toda o una región parcial que contiene un nucleótido en un sitio de mutación del gen de β -catenina o un mutante de la misma. El cebador de oligonucleótidos específico es una sonda que se puede hibridar con una diana de interés, es decir, un ácido nucleico de una región parcial de la secuencia de nucleótidos del gen de β -catenina o su mutante, o su secuencia complementaria, y no se hibrida sustancialmente con un ácido nucleico no diana, en condiciones apropiadas de hibridación o de lavado. Las condiciones apropiadas de hibridación o de lavado pueden estar de acuerdo con, por ejemplo, los métodos descritos en el libro (Documento no de patente 54) y similares. Dicho cebador se puede diseñar apropiadamente basándose en la información de la secuencia de nucleótidos del gen de β -catenina que tiene una mutación, y se puede adquirir por síntesis química según un método convencional. El diseño del cebador se puede realizar usando un método en sí conocido o un software bien conocido para el diseño.

Un ejemplo del cebador de oligonucleótidos puede ser un oligonucleótido que consiste en 10 a 60, preferentemente 15 a 30, más preferentemente 18 a 25 nucleótidos consecutivos, que se hibridan con parte de una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos de una región del lado 5' de un sitio de mutación del gen de β -

catenina que tiene una mutación. A medida que se hace más pequeño el tamaño del cebador, se vuelve mayor la especificidad por una secuencia de nucleótidos diana con la que se hibrida el cebador, pero se vuelve más pequeña la afinidad de unión. A diferencia, a medida que se vuelve mayor el tamaño, se vuelve mayor la afinidad de unión, pero se vuelve más baja la especificidad. Por tanto, es apropiado un cebador de oligonucleótidos que tiene el tamaño anteriormente mencionado. Dicho cebador de oligonucleótidos se usa preferentemente como un conjunto de cebadores de oligonucleótidos en combinación con un cebador de oligonucleótidos que tiene el tamaño anteriormente mencionado y que consiste en nucleótidos consecutivos, que hibrida parte de la secuencia de nucleótidos de una región lateral de 3' de un sitio de mutación del gen de β -catenina que tiene una mutación. Cuando se realiza la PCR usando dicho conjunto de cebadores, se amplifica un ácido nucleico de una región que incluye un nucleótido en un sitio de mutación del gen de β -catenina que tiene una mutación. Si el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene o no una mutación, se puede detectar determinando la secuencia de nucleótidos del producto amplificado por el método de secuenciación de ADN descrito anteriormente.

El cebador de oligonucleótidos también se puede ejemplificar por un oligonucleótido que consiste en 10 a 60, preferentemente 15 a 30, más preferentemente 18 a 25 nucleótidos consecutivos, que se hibrida con un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos parcial consecutiva que contiene un sitio de mutación del gen de β -catenina que tiene una mutación, o un ácido nucleico formado de una secuencia de nucleótidos parcial del gen de β -catenina no mutante, secuencia de nucleótidos parcial que consiste en un nucleótido en la posición en la que está presente una mutación de interés, o su oligonucleótido complementario. Dicho oligonucleótido o su oligonucleótido complementario no se limita a uno que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la secuencia de nucleótidos de una región parcial del gen de β -catenina que tiene una mutación, y puede ser un oligonucleótido que tiene alta homología de secuencias o su oligonucleótido complementario, en tanto que se pueda detectar una mutación de interés presente en el gen de β -catenina en condiciones apropiadas de hibridación o de lavado. El oligonucleótido que tiene alta homología de secuencias se refiere a uno que tiene 80 % o más, preferentemente 90 % o más, más preferentemente 95 % o más homología de secuencias, o uno con diferencia de 1 a 10 nucleótido(s), preferentemente 1 a 5 nucleótido(s), más preferentemente 1 o 2 nucleótido(s), todavía más preferentemente 1 nucleótido. La detección de la mutación del gen de β -catenina se puede realizar amplificando un ácido nucleico usando dicho cebador y detectando la presencia o ausencia del producto amplificado. Cuando el producto amplificado se encuentra por un cebador de oligonucleótidos designado basado en información de secuencias en el gen de β -catenina que tiene una mutación, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación de interés. Cuando el producto amplificado no se encuentra o su cantidad es pequeña en comparación con un control, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba no tiene mutación que se pueda detectar con el cebador. Cuando el producto amplificado se encuentra por un cebador de oligonucleótidos designado basado en la información de secuencias en el gen de β -catenina no mutante, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba no tiene mutación de interés. Cuando el producto amplificado no se encuentra o su cantidad es pequeña en comparación con un control, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación.

La sonda de oligonucleótidos es una sonda de oligonucleótidos específica para una cualquiera de las mutaciones anteriormente mencionadas del gen de β -catenina. La sonda de oligonucleótidos específica es una sonda que se puede hibridar con una diana de interés, es decir, una región parcial de la secuencia de nucleótidos de un gen de β -catenina mutante, cuya región incluye un nucleótido en un sitio en el que está presente una cualquiera de las mutaciones anteriormente mencionadas, y no se hibrida sustancialmente con un ácido nucleico no diana, en condiciones apropiadas de hibridación o de lavado. Se puede detectar un gen de β -catenina mutante detectando la hibridación de dicha sonda de oligonucleótidos con un gen diana. Las condiciones apropiadas de hibridación o de lavado pueden estar de acuerdo con, por ejemplo, los métodos descritos en el libro (Documento no de patente 54) y similares.

La sonda de oligonucleótidos puede ser cualquier sonda de oligonucleótidos diseñada de manera que se hibride específicamente con la secuencia de nucleótidos de toda, preferentemente una región parcial que contiene un nucleótido en un sitio de mutación del gen de β -catenina que tiene una mutación. Por ejemplo, se administra un oligonucleótido que consiste en 15 o más, preferentemente 15 a 500, más preferentemente 18 a 200, todavía más preferentemente 18 a 50 nucleótidos consecutivos, o su oligonucleótido complementario, que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de una región que contiene un nucleótido en una posición del gen de β -catenina que tiene una mutación en la que está presente la mutación. A medida que se vuelve más pequeño el tamaño de la sonda, se vuelve mayor la especificidad por una secuencia de nucleótidos diana con la que se hibrida la sonda, pero se vuelve más pequeña la afinidad de unión. A diferencia, a medida que se vuelve mayor el tamaño de la sonda, se vuelve mayor la afinidad de unión, pero se vuelve menor la especificidad. Por tanto, es apropiada una sonda de oligonucleótidos que tiene el tamaño anteriormente mencionado. Dicho oligonucleótido o su oligonucleótido complementario se pueden diseñar apropiadamente basándose en la información de secuencias de nucleótidos en el gen de β -catenina que tiene una mutación o gen de catenina no mutante, y se puede adquirir por síntesis química según un método convencional. Dicho oligonucleótido o su oligonucleótido complementario no se limita a uno que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la secuencia de nucleótidos de una región parcial del gen de β -catenina, y puede ser un oligonucleótido que tiene alta homología de secuencias o su oligonucleótido complementario, en tanto que una mutación de interés presente en el gen de β -catenina se detecte en condiciones apropiadas de hibridación o de lavado. El oligonucleótido que tiene alta homología de secuencias se refiere a uno

que tiene 80 % o más, preferentemente 90 % o más, más preferentemente 95 % o más homología de secuencias, o uno con diferencia de 1 a 10 nucleótido(s), preferentemente 1 a 5 nucleótido(s), más preferentemente 1 o 2 nucleótido(s), todavía más preferentemente 1 nucleótido. Cuando la hibridación de la sonda de oligonucleótidos diseñada basada en la información de secuencias de nucleótidos se encuentra en el gen de β -catenina que tiene una mutación, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación de interés. Cuando no se encuentra la hibridación, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba no tiene mutación de interés. Cuando se encuentra la hibridación de la sonda de oligonucleótidos diseñada basada en la información de secuencias de nucleótidos en el gen de β -catenina no mutante, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba no tiene mutación de interés. Cuando no se encuentra la hibridación, se puede determinar que el gen de β -catenina en la muestra de prueba tiene una mutación de interés.

La sonda de oligonucleótidos y el cebador de oligonucleótidos pueden cada uno contener un nucleótido que constituye una secuencia adicional, es decir, una secuencia de nucleótidos no complementaria al gen de β -catenina que va a detectarse, en un intervalo tal que no se altere la detección específica de la mutación del gen de β -catenina.

Además, la sonda de oligonucleótidos y el cebador de oligonucleótidos se pueden cada uno marcar con un agente de marcado apropiado, tal como un radioisótopo, una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia emisora de luz, o biotina. El uso de la sonda de oligonucleótidos y el cebador de oligonucleótidos marcados pueden facilitar detectar su hibridación con un gen diana. Ejemplos preferidos del radioisótopo pueden incluir ^{125}I , ^{131}I , ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P y ^{35}S . Ejemplos preferidos de la enzima pueden incluir β -galactosidasa, β -glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa. Ejemplos preferidos de la sustancia fluorescente pueden incluir fluorescamina e isotiocianato de fluoresceína. Ejemplos preferidos de la sustancia emisora de luz pueden incluir luminol, un derivado de luminol, luciferina y lucigenina. Alternativamente, en la proximidad de un colorante fluorescente indicador tal como FAM[™] o VIC[™], se puede unir adicionalmente un extintor (sustancia extintora) para absorber la energía de fluorescencia emitida del colorante fluorescente. En dicha realización, el colorante fluorescente y el extintor se separan entre sí en una reacción de detección y se detecta la fluorescencia emitida.

El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo, en tanto que el anticuerpo se una específicamente a una β -catenina mutante. Además, un isotipo del mismo puede ser de cualquier isotipo, preferentemente un anticuerpo IgG. Dicho anticuerpo se puede producir usando como antígeno una β -catenina mutante deseada, específicamente una β -catenina mutante que tiene una cualquiera de las mutaciones de aminoácido anteriormente mencionadas. El antígeno puede ser una proteína de longitud completa de una β -catenina mutante, o puede ser un péptido parcial de la misma, consistiendo el péptido en una región que contiene un sitio en el que está presente una mutación de aminoácido. El antígeno consiste en al menos 8, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 12, todavía más preferentemente 15 o más aminoácidos. Dicha proteína de longitud completa y péptido parcial se pueden producir como: células en las que un ácido nucleico que codifica la proteína o péptido se expresa por una técnica de ingeniería genética general (por ejemplo, Documentos no de patente 54 a 56); un producto de síntesis sin células; o un producto de síntesis química. Alternativamente, la proteína de longitud completa y el péptido parcial se pueden preparar a partir de las células o muestras derivadas de organismos vivos, o pueden ser sus productos purificados.

La producción del anticuerpo se puede realizar utilizando un método de producción de anticuerpos en sí conocido. Por ejemplo, el anticuerpo se obtiene administrando a un animal el antígeno en presencia o ausencia de un adyuvante, solo, o después de que el antígeno se haya unido a un vehículo, para así realizar la inducción inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular. El vehículo no está particularmente limitado, en tanto que el propio vehículo no presente ninguna acción adversa en un hospedador y pueda potenciar la antigenicidad. Ejemplos de los mismos pueden incluir celulosa, un aminoácido polimerizado, albúmina y hemocianina de lapa californiana. Ejemplos del adyuvante pueden incluir adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund (FIA), Ribi (MPL), Ribi (TDM), Ribi (MPL+TDM), vacuna de *Bordetella pertussis*, muramil dipéptido (MDP) y un adyuvante de aluminio (ALUM), y sus combinaciones. Por ejemplo, se usan adecuadamente un ratón, una rata, un conejo, una cabra y un caballo como animal para la inmunización.

El anticuerpo puede ser cualquiera de un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal. El anticuerpo policlonal se puede adquirir de suero de un animal sometido a medios de inmunización por un método de recogida de anticuerpos en sí conocido. Como medios preferidos de recogida de anticuerpos, se da un método de cromatografía de inmunoafinidad. El anticuerpo monoclonal se puede producir usando un método conocido tal como un método de hibridoma (Documento no de patente 57). La selección de un hibridoma para producir un anticuerpo de interés se puede realizar, por ejemplo, por cribado por un método conocido (Documentos no de patente 58 y 59). Es decir, se puede obtener un anticuerpo deseado: realizando una prueba en la unión entre un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma y una β -catenina mutante de interés; y selección de un anticuerpo que se une específicamente a la β -catenina mutante de interés.

El anticuerpo puede ser cualquiera de un anticuerpo intacto y un fragmento de anticuerpo. El "anticuerpo intacto" significa un anticuerpo compuesto de una unidad estructural tetrámera similar a la de un anticuerpo natural. El "fragmento de anticuerpo" significa un fragmento que contiene parte del anticuerpo intacto, por ejemplo, una región de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos del fragmento de anticuerpo incluyen un

fragmento Fab, un fragmento Fab₁, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, una molécula de anticuerpo monocatenario y un anticuerpo multiespecífico que se forma a partir de fragmentos de anticuerpos. El "fragmento Fab" es un fragmento de unión al antígeno que tiene un único sitio de unión al antígeno, y se pueden producir dos fragmentos Fab idénticos que tienen cada uno un único sitio de unión al antígeno a partir de un anticuerpo sometiendo el anticuerpo a digestión con papaína. El "fragmento F(ab')₂" es un fragmento de anticuerpo que se puede producir sometiendo un anticuerpo a tratamiento con pepsina, y es todavía capaz de reticulación de antígenos. El "fragmento Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento del antígeno completo y sitio de unión al antígeno, y está compuesto por un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera estrechamente unidos mediante un enlace no covalente. La mitad de Fv que contiene un único dominio variable o solo tres CDR específicas de antígeno puede reconocer un antígeno y se puede unir al mismo. Un fragmento "Fv de una única cadena" o "sFv" de anticuerpo que es una molécula de anticuerpo de una sola cadena tiene la característica de que contiene un dominio VH y dominio VL de un anticuerpo, en los cuales estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. Un polipéptido Fv puede contener además un conector polipeptídico, que permite que sFv forme una estructura deseada para la unión al antígeno, entre el dominio VH y el dominio VL. El término "diacuerpo" se refiere a un pequeño fragmento de anticuerpo que tiene dos sitios de unión al antígeno, y este fragmento contiene un dominio variable de la cadena pesada (VH) unido a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (Vn-VL). Se usa un conector corto para permitir la asociación entre los dos dominios en la misma cadena, que permite la asociación de los dominios con dominios complementarios en la otra cadena para producir dos sitios de unión al antígeno.

El cebador de oligonucleótidos, sonda de oligonucleótidos y anticuerpo que se pueden usar como reactivo en los métodos según la presente invención pueden ser los proporcionados como una matriz de ácido nucleico o matriz de anticuerpo uniéndose sobre un soporte apropiado. El soporte no está particularmente limitado y puede ser de cualquier forma o material, en tanto que un ácido nucleico o una proteína se pueda fijar sobre el soporte. Ejemplos específicos de los mismos pueden incluir un soporte hecho de un material inorgánico tal como vidrio, una oblea de silicio, perlas, una resina, o un metal, y un soporte hecho de un material de polímero natural tal como nitrocelulosa o un material de polímero sintético tal como nailon.

En lo sucesivo, la presente invención se describe más específicamente a modo de Ejemplos.

Primero, se describen los materiales y métodos usados en los ejemplos.

Se usaron las siguientes líneas celulares en los ejemplos: células A375, células A2058, células HT29, células colo-205, células SK-MEL-1, células colo-201, células LS-174T, células HCT_116, células SW620, células DLD-1, células A549, células OVCAR-5, células AN3-CA, células DU145, células NCI-N87, células JIMT-1, células SW48, SW480, células A431, células HeLa, células EC109, células Ms-1, células LNCaP y células PC-3.

Los fármacos usados son los inhibidores de MEK SMK-17 (fabricado por Daiichi Sankyo Company, Limited) y U0126 (fabricado por Sigma), un inhibidor de PI3K LY294002 (fabricado por Sigma), un inhibidor de MEK y MAPK PD184352 (sintetizado por Daiichi Sankyo Company, Limited), un inhibidor de multincinasas sorafenib (sintetizado por Daiichi Sankyo Company, Limited) y un inhibidor selectivo de BRAF SB590885 (sintetizado por Daiichi Sankyo Company, Limited).

Las líneas celulares se cultivaron en condición de 37 °C y 5 % de CO₂ en un medio de cultivo que es medio RPMI 1640 (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), se sometieron a esterilización con vapor de agua a alta presión y se complementaron con 0,1 g/l de kanamicina (fabricado por Sigma), 100 unidades/ml de penicilina F y 0,3 g/l de L(+)-glutamina (fabricado por Wako), cada uno se sometió a esterilización por filtración, 2,5 g/l de NaHCO₃ se someten a esterilización con vapor de agua a alta presión y 10 % de suero bovino fetal (FBS). Las células se subcultivaron cada 3 días para prevenir que las células llegaran a ser superconfluentes, que causa la transformación de las células durante el cultivo. Después de la retirada del medio de cultivo, las células se lavaron con una disolución de tampón fosfato libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (PBS: 8,0 g/l de NaCl, 0,2 g/l de KCl, 0,916 g/l de Na₂HPO₄, 0,2 g/l de KH₂PO₄), y las células se desprendieron mediante tratamiento con una disolución de tripsina-ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) (0,75 g/l de tripsina, 8,0 g/l de NaCl, 0,4 g/l de KCl, 0,0475 g/l de Na₂HPO₄, 0,06 g/l de KH₂PO₄, 1,0 g/l de glucosa, 0,02 g/l de rojo de fenol, 0,35 g/l de NaHCO₃, 0,2 g/l de EDTA) y se subcultivaron.

Se realizó una prueba de actividad supresora del crecimiento celular en ambos del cultivo bidimensional y cultivo tridimensional. Primero, se produjo una placa para cultivo tridimensional. Específicamente, se añadió poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (abreviado en lo sucesivo poli-HEMA, fabricado por Sigma) a 95 % de etanol de manera que la concentración fuera 5 mg/ml, y se disolvió en él a 37 °C durante la noche. La disolución se usó como disolución de poli-HEMA. La disolución se cargó en una placa de 96 pocillos (fabricada por Nunc) a 50 µl/pocillo. La placa se secó a 37 °C para producir una placa para cultivo tridimensional recubierta con poli-HEMA.

Se realizaron el cultivo bidimensional (denominado algunas veces en lo sucesivo cultivo 2D) y el cultivo tridimensional (denominado algunas veces en lo sucesivo cultivo 3D) por siembra de las células en una placa de 96 pocillos a 1×10³ células/150 µl/pocillo y 2×10³ células/75 µl/pocillo, respectivamente, y realizando el tratamiento con fármaco al día siguiente. El volumen total se estableció hasta 200 µl en el cultivo bidimensional, y el volumen total se

estableció hasta 100 µl en el cultivo tridimensional. Se midió el crecimiento celular midiendo las cantidades de ATP intracelular en el momento del tratamiento con fármaco y 72 horas después del tratamiento con fármaco. Específicamente, después de la retirada del medio de cultivo a 100 µl/pocillo, se añadió CellTiter-Glo (fabricado por Promega) a 50 µl/pocillo en el cultivo bidimensional, y se añadió CellTiter-Glo a 50 µl/pocillo en el cultivo tridimensional. Después de la adición, la placa se agitó con un agitador durante 2 minutos y se dejó reposar inmóvil a temperatura ambiente durante 10 minutos. El volumen total de cada pocillo se transfirió a una placa blanca de 96 pocillos (fabricada por Nunc) y se midió para su intensidad de emisión de luz con un contador multimarca Wallac 1420 (fabricado por Perkin Elmer). De la cantidad de emisión de luz resultante, se determinó una relación de crecimiento (Crecimiento (%)) con respecto a una muestra no tratada con fármaco después de 72 horas usando la siguiente fórmula matemática 1 y fórmula matemática 2. Además, se definió como GI₅₀ una concentración de fármaco que causa el 50 % inhibición del crecimiento. Se debe observar que en la fórmula 1 y la fórmula 2, "día 4 comp" representa una cantidad de emisión de luz de una muestra 72 horas después del tratamiento con fármaco, "blanco" representa una cantidad de emisión de luz de un medio de cultivo solo, "día 4 de control" representa una cantidad de emisión de luz de una muestra no tratada con fármaco después de 72 horas, y "día 1 de control" representa una cantidad de emisión de luz de una muestra en el momento del tratamiento con fármaco.

Fórmula matemática 1

0 ~100 %

$$\text{Crecimiento (\%)} = \frac{(\text{día 4 comp} - \text{blanco})}{(\text{día 4 de control} - \text{blanco})} \times 100$$

Fórmula matemática 2

20 0 ~ -100 %

$$\text{Crecimiento (\%)} = \frac{(\text{día 4 comp} - \text{blanco})}{(\text{día 4 de control} - \text{blanco})} \times 100 - 100$$

Se evaluó una correlación entre los resultados en el cultivo 2D y los resultados en el cultivo 3D con un coeficiente de correlación del producto-momento de Pearson.

Se usó el coeficiente de correlación del producto-momento de Pearson resultante para realizar una prueba de significancia. Cuando se supone que una hipótesis nula H_0 es el "coeficiente de correlación de la población=0", es decir, "no existe correlación", y la hipótesis no se rechaza, se puede decir que no existe correlación. A diferencia, cuando se rechaza la hipótesis, se puede decir que existe una correlación. Cuando el número de muestras se representa por n y un coeficiente de correlación de muestra se representa por r , una t_0 estadística de la prueba se representa por la siguiente fórmula matemática 3. Esto sigue a una distribución de la t con un grado de libertad de $n-2$, y la hipótesis nula se rechaza si $t_0 > t(n-2, \alpha)$, donde α representa una tasa crítica.

Fórmula matemática 3

$$t_0 = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Se realizó transferencia Western para detectar una proteína como se describe a continuación. Primero, se obtuvo una muestra por siembra de células en una placa de 6 pocillos (fabricada por Greiner), seguido por tratamiento con un fármaco, y se lavó con PBS⁻ que contenía Na₃VO₄ (1 mM) sobre hielo, y luego se añadió con una cantidad apropiada de tampón RIPA (HEPES 25 mM, 1,5 % de Triton X-100, 1,0 % de desoxicolato de sodio, 0,1 % de dodecilsulfato de sodio (abreviado en lo sucesivo SDS), NaCl 0,5 M, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, 0,1 mg/ml de leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (abreviado en lo sucesivo PMSF): pH 7,8). Las células se solubilizaron y se recogieron y luego se dejaron reposar inmóviles sobre hielo durante 30 minutos. Se realizó el tratamiento de centrifugación a 13.000 g durante 15 minutos, y se usó el sobrenadante resultante como un extracto de células.

En la detección de células no adherentes y proteínas relacionadas con la apoptosis, se recogió un medio de cultivo en un tubo de 15 ml, y las células se lavaron con PBS⁻ que contenía Na₃VO₄ (1 mM). Después de eso, se realizó la centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante. El residuo se añadió con 1 ml de PBS⁻ para suspender las células. La suspensión se transfirió a un tubo de 1,5 ml y entonces se sometió a centrifugación a 13.000 g durante 1 minuto, y se retiró el sobrenadante. Se añadió una cantidad apropiada de tampón RIPA a células adherentes de manera que se solubilizaran las células. Las células se recogieron y luego se dejaron reposar inmóviles sobre hielo durante 30 minutos. La centrifugación se realizó a 13.000 g durante 15 minutos, y se usó el sobrenadante resultante como un extracto de células.

Se añadieron los extractos de células, cuya concentración de proteína se estableció hasta una uniforme, con la mitad de cantidad de 3× tampón de muestra SDS (Tris 150 mM, 30 % de glicerol, 3 % de SDS, 1,5 mg/100 ml de azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol 100 mM: pH 6,8), y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos. Lo resultante se usó como una muestra para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

- 5 La muestra se sometió a electroforesis con un gel de poli(acrilamida) y se transfirió sobre una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) (Hybond P: fabricada por Millipore), y entonces se bloqueó con una disolución de TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, 0,1 % de Tween 20: pH 7,6) que contenía albúmina de suero bovino (abreviada BSA) o leche desnatada durante 30 minutos. Se añadió un anticuerpo primario a cada disolución a una relación de 1:1.000, seguido por agitación a 4 °C durante la noche. Después de lavar con una disolución de TBS-Tween, lo resultante se sumergió en una disolución de anticuerpo secundario (1:5000, 3 % de leche desnatada) que contenía un anticuerpo anti-conejo de peroxidasa de rábano picante (fabricado por Amersham) o un anticuerpo anti-ratón de peroxidasa de rábano picante (fabricado por Amersham) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con una disolución de TBS-Tween, se realizó el desarrollo de color con un líquido de desarrollo de color de electroquimioluminiscencia (ECL) (fabricado por Millipore) para la detección con LAS1000 (fabricado por Fuji Film). Para la electroforesis, se usó tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0,1 % de SDS). Para la transferencia, se usó tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20 % de metanol).

- Se realizó una medición del ciclo celular por tinción con yoduro de propidio (PI) como se describe a continuación. Primero, las células se sometieron a tratamiento con fármaco después de 24 horas a partir de la siembra de las mismas en una placa de 6 pocillos. Después de recoger el medio de cultivo y tripsinar las células, se sometieron a centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos, y el sobrenadante se retiró. Se añadió 1 ml de PBS⁻ para suspender las células. La suspensión se transfirió a un tubo de 1,5 ml y luego se sometió a tratamiento por centrifugación a 13.000 g durante 1 minuto, y el sobrenadante se retiró. Se añadieron 200 µl de PBS⁻ al residuo para suspender las células, y se añadió 1 ml de etanol al 70 % frío en hielo. Entonces, las células se agitaron con vórtex y se inmovilizaron a 4 °C.

- 25 Las células inmovilizadas se sometieron a centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante. Se añadió 1 ml de una disolución de PBS⁻ que contenía 10 µg/ml de RNasa al residuo para suspender las células, que se dejaron reposar inmóviles a 37 °C durante 20 minutos. Después de esto, la centrifugación se realizó durante 5 minutos, y luego se retiró el sobrenadante. Se añadieron 500 µl de una disolución de PBS⁻ que contenía PI (50 µg/ml, fabricada por Wako) al residuo para suspender las células. El volumen total de la misma se pasó a través de una malla de nailon (φ=42 µm) y se usó como muestra. Se detectó un contenido de ADN intracelular con PMT4 de un citómetro de flujo (fabricado por Beckman Coulter) para medir un ciclo celular.

- Se realizó un ensayo indicador TOPFLASH como se describe a continuación. Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos (2 ml/pocillo) de manera que las células llegaran a ser subconfluentes al siguiente día. Se realizó la transfección génica al día siguiente. Se añadieron un plásmido indicador ATCF (TOPFLASH, fabricado por Millipore), un plásmido indicador de luciferasa de renilla del promotor de TK (fabricado por Promega) y Plus Reagent (fabricado por Sigma) a 500 µl de OPTI-MEM I (2,44 g/l de NaHCO₃, 13,6 g/l de OPTI-MEM I (fabricado por Gibco)), y se mezclaron por inversión. La mezcla se dejó reposar inmóvil a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de esto, se añadió Lipofectamine LTX (fabricado por Sigma), y la mezcla se dejó reposar inmóvil a temperatura ambiente durante 30 minutos. El volumen total de la misma se añadió al medio de cultivo para cultivar las células. Después de 24 horas, las células se sembraron otra vez en una placa blanca de 96 pocillos a 2×10⁴ células/75 µl/pocillo. El tratamiento con fármaco se realizó al día siguiente. El volumen total se estableció hasta 100 µl, y las células se cultivaron durante 24 horas. Después de esto, se retiró el medio de cultivo en cada pocillo y se sustituyó con PBS⁻ a 100 µl/pocillo, y las células se congelaron a -80 °C, excepto las células colo-201 que se congelaron a -80 °C directamente sin la sustitución con PBS⁻.

- 45 En el momento de un ensayo, las células se descongelaron y se añadieron con Dual-Glo luciferase Reagent (fabricado por Promega) a 50 µl/pocillo, que se dejó reposar inmóvil durante 5 minutos. Después de esto, se midió la intensidad de emisión de luz de la luciferasa de luciérnaga con un contador multimarca de Wallac 1420. A continuación, se añadió Dual-Glo Stop & Glo Reagent (fabricado por Promega) a 50 µl/pocillo, y se dejó que el conjunto reposara inmóvil durante 5 minutos. Después de esto, se midió la intensidad de emisión de luz de luciferasa de renilla con un contador multimarca Wallac 1420. A partir de los datos obtenidos, se determinó la actividad transcripcional de TCF4 (actividad transcripcional de TCF) usando la siguiente fórmula matemática 4.

Fórmula matemática 4

$$\text{Actividad transcripcional de TCF4} = \frac{\text{luc de luciérnaga (CPM)}}{\text{luc de Renilla (CPM)}}$$

- 55 Se realizó la inactivación de β-catenina usando ARNip. Específicamente, la inactivación de β-catenina se realizó por un método de transfección inversa usando Stealth RNAi (fabricado por Invitrogen). Se muestra a continuación la secuencia del ARNip usado:

5'-AUUACUAGAGCAGACAGAUAGCACC-3' (SEQ ID NO: 3).

A 100 μ l de OPTI-MEM I, se añadieron HiPerFect (fabricado por Qiagen) diluido 300 veces y el ARNip a una concentración final de 5 nM, y el contenido se mezcló suavemente y se dejó reposar inmóvil a temperatura ambiente durante 10 minutos. Además, se usó control negativo de Stealth RNAi (fabricado por Invitrogen) como control. La disolución mezclada se añadió a cada pocillo de una placa de 12 pocillos (fabricada por Nunc) o una placa de 60 mm (fabricada por Greiner), y se sembró en ella una suspensión de células ($1,2 \times 10^5$ células/600 μ l/pocillo para la placa de 12 pocillos y $1,3 \times 10^5$ células/2,4 ml/placa para la placa de 60 mm). Al día siguiente, el medio de cultivo se intercambié por un nuevo, y se evaluó la actividad inductora de la apoptosis midiendo la eficiencia de transfección por transferencia Western y midiendo un ciclo celular con un citómetro de flujo.

Se realizaron la transfección génica con TCF4 negativo dominante y la transfección génica con β -catenina activa como se describe a continuación. Primero, las células (2 ml/pocillo) se sembraron en una placa de 6 pocillos de manera que las células llegaran a ser subconfluentes al día siguiente. La transfección génica se realizó al día siguiente. Se añadieron 2,5 μ g de un vector de control (fabricado por Invitrogen) o un plásmido TCF4 negativo dominante (abreviado en lo sucesivo DN-TCF4, fabricado por Millipore) o un plásmido de β -catenina activa a 500 μ l de OPTI-MEM I junto con 2,5 μ l de Plus Reagent, y se mezcló por inversión. La mezcla se dejó reposar inmóvil a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de esto, se añadieron 10 μ l de Lipofectamine LTX, y la mezcla se dejó reposar inmóvil a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió el volumen total de la misma al medio de cultivo para cultivar las células. Después de 24 horas, las células se sembraron otra vez, y se realizaron diversos ensayos.

Ejemplo 1

Se compararon las sensibilidades a los fármacos con un inhibidor de MEK SMK-17 entre líneas celulares. Específicamente, se usaron 24 tipos de líneas celulares que tenían mutaciones de proteína implicadas en las diversas vías de señalización asociadas a crecimiento celular para evaluar la actividad supresora del crecimiento de un inhibidor de MEK SMK-17 (Daiichi Sankyo Company, Limited.) en cultivo bidimensional y cultivo tridimensional. Además, se usó un inhibidor de MEK U0126 como material comparativo para evaluar la actividad supresora del crecimiento del mismo modo que antes.

Se evaluó la actividad supresora del crecimiento midiendo una cantidad de ATP intracelular en términos de cantidad de emisión de luz de luciferasa mediante el uso de CellTiter-Glo. Específicamente, las células se sometieron 24 horas después de la siembra de las mismas a tratamiento con fármaco añadiendo SMK-17 y U0126 a medios de cultivo de manera que las concentraciones finales fueran 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 y 30 μ M. 72 horas después del tratamiento con fármaco, se midió una cantidad de ATP intracelular usando CellTiter-Glo. De la cantidad de emisión de luz resultante, se calculó una relación de crecimiento, y se calculó adicionalmente una concentración de fármaco que causó 50 % de inhibición del crecimiento (GI_{50}). Basándose en GI_{50} , se evaluó una correlación entre el resultado del cultivo bidimensional y el resultado del cultivo tridimensional usando un coeficiente de correlación del producto-momento de Pearson. Se determinó que los coeficientes de correlación del producto-momento r entre el cultivo bidimensional y el cultivo tridimensional para los fármacos eran del siguiente modo: $r=0,88$ para SMK-17 y $r=0,72$ para U0126. Se realizó una prueba de significancia basándose en los coeficientes de correlación del producto-momento. Como resultado, las estadísticas de las pruebas fueron del siguiente modo: $r=8,0$ para SMK-17 y $r=4,5$ para U0126. El número de muestras n fue 21. Se rechazó la hipótesis nula en ambos compuestos basándose en $t(19, 0,01)=2,9$, que mostró una correlación entre el cultivo bidimensional y el cultivo tridimensional.

A continuación, para comparar las mutaciones génicas y las sensibilidades a fármacos de las líneas celulares, se calculó $-\log(GI_{50})$ a partir de GI_{50} obtenida para ambos fármacos en el cultivo bidimensional y el cultivo tridimensional, y el valor se expresó en un patrón de huella, estando un valor promedio (MG-MID) en el origen (Documento no de patente 50). A este respecto, las líneas celulares que tenían valores positivos de $-\log(GI_{50})$ se consideraron líneas celulares de alta sensibilidad, y las líneas celulares que tenían valores negativos de $-\log(GI_{50})$ se consideraron líneas celulares de baja sensibilidad. Además, con respecto a las mutaciones de BRAF, K-ras, PTEN, β -catenina y APC, las líneas celulares se dividieron en un grupo de línea celular mutante y un grupo de línea celular no mutante, y se evaluó una diferencia significativa en valor promedio de GI_{50} entre los dos grupos por una prueba de la t .

Como se muestra en la FIG. 1, se encontró en la prueba de actividad supresora del crecimiento de SMK-17 que las líneas celulares que tenían mutaciones activas de BRAF presentes aguas arriba de MEK, es decir, A375, HT29, colo-205 y colo-201, presentaron cada una alta sensibilidad.

Además, hubo una diferencia significativa a $p<0,001$ en el valor promedio de GI_{50} entre el grupo de línea celular mutante activo de BRAF y el grupo de línea celular no mutante. Este hecho sugirió que la mutación activa de BRAF era un factor determinante de la sensibilidad positiva para SMK-17, al igual que con los inhibidores de MEK existentes tales como PD184352. A continuación, entre las líneas celulares que tienen mutaciones activas de K-ras localizadas aguas arriba de BRAF, las células LS-174T, las células HCT_116, las células SW480 y las células SW620 fueron líneas celulares de alta sensibilidad, mientras que las células A549, las células OVCAR-5 y las células DLD-1 fueron líneas celulares de baja sensibilidad. Además, no hubo diferencia significativa en el valor promedio de

5 GI_{50} entre el grupo de línea celular mutante activo de K-ras y el grupo de línea celular no mutante. Este hecho sugirió que la mutación activa de K-ras no era un factor determinante de la sensibilidad para SMK-17. Por otra parte, todas las líneas celulares deficientes en PTEN, AN3-CA, LNCaP y PC-3 fueron líneas celulares de baja sensibilidad. No hubo diferencia significativa en el valor promedio de GI_{50} entre el grupo de líneas celulares deficientes en PTEN y el
 10 grupo de líneas celulares no mutantes, pero la línea celular deficiente en PTEN A2058 que tiene una mutación activa de BRAF tubo menor sensibilidad que las otras líneas celulares mutantes activas de BRAF, sugiriendo que la deficiencia de PTEN era un factor determinante de la sensibilidad negativo para SMK-17. Además, con respecto a BRAF, K-ras y PTEN, las líneas celulares no mutantes (A431, DU145, EC109, HeLa, Ms-1, NCI-N87 y JIMT-1) fueron líneas celulares de baja sensibilidad, sugiriendo que el crecimiento celular de estas líneas celulares no
 15 dependió de la vía de señalización de MAPK. Por otra parte, con respecto a BRAF, K-ras y PTEN, a pesar del hecho de que la mayoría de las líneas celulares no mutantes fueron líneas celulares de baja sensibilidad, las células SW48 que no tenían BRAF, K-ras y PTEN mutante presentaron alta sensibilidad a SMK-17.

20 Las células SW48, que han presentado alta sensibilidad a SMK-17, son una línea celular que tiene BRAF, K-ras y PTEN no mutante y que tienen una mutación activa de β -catenina. En vista de este hecho, cuando la atención se centra en una mutación en la vía de señalización de Wnt/ β -catenina que incluye β -catenina como factor constituyente, todas las líneas celulares mutantes de β -catenina activa colo-205, colo-201, SK-MEL-1, LS-174T, HCT_116 y SW48 fueron líneas celulares de alta sensibilidad. En proteínas implicadas en la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, también se ha informado de una mutación de APC. Entre las líneas celulares mutantes de APC, colo-205, colo-201, SW480 y SW620 presentaron alta sensibilidad. Además, se probaron el grupo de líneas celulares mutantes de β -catenina activa, el grupo de líneas celulares mutantes de APC y el grupo de líneas celulares de β -catenina activa y de APC para diferencias significativas en el valor promedio de GI_{50} con respecto al grupo de líneas celulares no mutantes que resultaron en mostrar diferencias significativas a $p < 0,001$, $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente. Este hecho sugirió que la mutación en la vía de señalización de Wnt/ β -catenina fue un factor positivo determinante de la sensibilidad para SMK-17.

25 A continuación, con respecto a U0126, que era un inhibidor de MEK similar a SMK-17, 23 de los 24 tipos de líneas celulares presentaron una tendencia de sensibilidad al fármaco similar a en el caso de SMK-17. Además, se realizó la evaluación de una correlación entre SMK-17 y U0126 usando cada GI_{50} , que da $r=0,82$ y $t_0=6,9$ como resultado. En este caso, se rechazó la hipótesis nula basándose en $t(22, 0,01)=2,8$, que mostró una correlación entre SMK-17 y U0126. Además, hubo diferencias significativas en el valor promedio de GI_{50} con respecto a la mutación activa de BRAF, la mutación activa de β -catenina, la mutación de APC y de β -catenina activa y la mutación de APC con respecto al grupo de líneas celulares no mutantes a $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente. Este hecho sugirió que la mutación activa de BRAF y la mutación en la vía de señalización Wnt fueron factores positivos determinantes de la sensibilidad para U0126, así como SMK-17, mientras que la deficiencia de PTEN era un factor negativo determinante de la sensibilidad.

35 Los resultados anteriormente mencionados revelaron que la mutación activa de β -catenina era un factor positivo determinante de la sensibilidad para el inhibidor de MEK SMK-17.

Ejemplo 2

40 Se evaluaron la parada del ciclo celular mediada por un inhibidor de MEK SMK-17 y su actividad inductora de la apoptosis. El Ejemplo 1 reveló que existen líneas celulares para las que SMK-17 presentó alta actividad supresora del crecimiento. La actividad supresora del crecimiento es probablemente debida a la parada del ciclo celular o muerte celular tal como la apoptosis. En vista de lo anterior, se evaluaron las influencias de SMK-17 sobre el ciclo celular y la apoptosis de una línea celular de alta sensibilidad.

45 Se realizaron la evaluación de la parada del ciclo celular mediada por SMK-17 y la actividad inductora de su apoptosis usando un total de 9 líneas celulares que incluyen DLD-1, una línea celular de baja sensibilidad que tiene un mutación activa K-ras y una mutación de APC, además de las líneas celulares en las que SMK-17 presentó alta actividad supresora del crecimiento, es decir, A375 (mutación activa de BRAF), HT29 (mutación activa de BRAF, mutación de APC), HCT_116 (mutación activa de K-ras, mutación activa de β -catenina), SW48 (mutación activa de β -catenina), colo-201 (mutación activa de β -catenina, mutación de APC), LS-174T (mutación activa de K-ras, mutación activa de β -catenina), SW620 (mutación activa K-ras, mutación de APC) y SW480 (mutación activa de K-ras, mutación de APC). Las células se sometieron después de 24 horas desde su siembra a tratamiento con fármaco que implica añadir SMK-17 a un medio de cultivo de manera que las concentraciones finales fueran 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 y 10 μ M. 48 horas después del tratamiento con fármaco, las células se recogieron y se sometieron a fijación con etanol y tinción PI para medir un contenido de ADN con un citómetro de flujo. Además, para medir la actividad inhibitoria por MEK de SMK-17 en las células tratadas con fármaco, se evaluó la expresión de ERK, ERK fosforilada y actina en las células con SMK-17 por transferencia Western 24 horas después del tratamiento. Además, se calculó
 55 la cantidad de expresión de una molécula diana que está fosforilada en comparación con la cantidad de expresión de una molécula diana para evaluar la influencia sobre un ciclo celular a dicha concentración para inhibir 95 % o más la expresión de fosforilación de la molécula diana. Entonces, cuando se encontró un aumento en la población sub-G1 del 20 % o más, se determinó que se indujo la apoptosis.

En las células HCT_116, las células SW48, células colo-201 y células LS-174T, todas las cuales tienen mutaciones de β -catenina activa, el tratamiento con SMK-17 a dicha concentración a la que se inhibió completamente la fosforilación de ERK, produjo la observación de un aumento sorprendente en la población sub-G1 y fragmentación de ADN. Específicamente, en las células HCT_116, las células SW48, las células colo-201 y las células LS-174T, el tratamiento con SMK-17 a concentraciones de 10 μ M, 10 μ M, 1,0 μ M y 10 μ M, respectivamente, produjo observaciones de inhibición completa de la fosforilación de ERK, y la inducción de la apoptosis indicada por un aumento en la población sub-G1 y fragmentación de ADN.

Por otra parte, en las células A375, las células HT29 y las células SW480, el tratamiento con SMK-17 a dicha concentración a la que se inhibió completamente la fosforilación de ERK, produjo observaciones de reducción en las relaciones de una población S y una población G2/M en gran medida y la sorprendente parada de G1, pero no la fragmentación de ADN. Específicamente, en las células A375, las células HT29 y las células SW480, el tratamiento con SMK-17 a concentraciones de 1,0 μ M, 3,0 μ M y 3,0 μ M, respectivamente, produjo observaciones de inhibición completa de la fosforilación de ERK y parada del ciclo celular. En las células SW620 y células DLD-1 tratadas con SMK-17 a dicha concentración a la que se inhibió completamente la fosforilación de ERK es decir, 1,0 μ M, no se observó influencia sobre un ciclo celular.

La FIG. 2 muestra resultados típicos. Los resultados revelaron que el inhibidor de MEK SMK-17 indujo la apoptosis selectivamente en la línea celular que tiene una mutación activa de β -catenina.

Ejemplo 3

Se evaluó la actividad inductora de la apoptosis de un inhibidor de la vía de señalización de MAPK. En el Ejemplo 2, se reveló que el inhibidor de MEK SMK-17 indujo la apoptosis selectivamente en la línea celular que tenía una mutación activa de β -catenina. MEK es un factor aguas abajo en la vía de señalización de MAPK. En vista de lo anterior, se inhibió la vía de señalización de MAPK por los inhibidores de la vía de señalización de MAPK distintos de SMK-17 para investigar sus actividades inductoras de la apoptosis.

Se investigaron las actividades inductoras de la apoptosis de un inhibidor de MEK PD184352, un inhibidor de multinasas sorafenib, que inhibió, en particular, Raf (Documento no de patente 61), y un inhibidor selectivo de BRAF SB590885 usando líneas celulares de β -catenina no mutante A375 y HT29, una línea celular mutante APC DLD-1 y líneas celulares de β -catenina activa mutante HCT_116 y SW48. Las células se trataron con PD184352 a 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 y 10 μ M y sorafenib y SB590885 a 0,3, 1,0, 3,0 y 10 μ M. 48 horas después del tratamiento con fármaco, las células se recogieron y se sometieron a fijación con etanol y tinción PI para medir un contenido de ADN con un citómetro de flujo. Además, para medir la actividad inhibitoria de la molécula diana en las células tratadas con fármaco, se evaluó la expresión de ERK, ERK fosforilada, MEK, MEK fosforilada y actina en las células por transferencia Western 24 horas después del tratamiento con fármaco. Además, se calculó la cantidad de expresión de una molécula diana que se fosforila en comparación con la cantidad de expresión de una molécula diana para evaluar la influencia de cada inhibidor sobre un ciclo celular a dicha concentración a la que se inhibió 95 % o más la expresión de la fosforilación de la molécula diana. Entonces, cuando se encontró un aumento en la población sub-G1 del 20 % o más, se determinó que se indujo la apoptosis.

Como se muestra en la FIG. 3, se indujo la apoptosis en las líneas celulares mutantes de β -catenina activa HCT_116 y SW48 por el tratamiento con el inhibidor de MEK PD184352 a dichas concentraciones a las que se inhibió completamente la fosforilación de ERK, es decir, 3,0 μ M y 3,0 μ M, respectivamente. Este hecho reveló que PD184352 también inhibió MEK e indujo la apoptosis selectivamente en las células mutantes de β -catenina activa, como con SMK-17.

Además, se indujo la apoptosis en la línea celular mutante de β -catenina activa HCT_116 por el tratamiento con el inhibidor selectivo de BRAF SB590885 a dicha concentración a la que se inhibió completamente la fosforilación de MEK y ERK, es decir, 10,0 μ M. Por otra parte, se indujo la parada de G1, pero no se indujo la apoptosis en la línea celular no mutante de β -catenina A375 por el tratamiento con el inhibidor selectivo de BRAF SB590885 a dicha concentración a la que se inhibió completamente la fosforilación de MEK y ERK, es decir, 1,0 μ M. Este hecho reveló que SB590885 indujo la apoptosis selectivamente en las células mutantes de β -catenina activa.

Mientras tanto, se indujo la sorprendente parada de G1, pero no se indujo la apoptosis en las líneas celulares no mutantes de β -catenina A375 y HT29 por el tratamiento con PD184352 a dichas concentraciones a las que se inhibió completamente la fosforilación de ERK, es decir, 0,30 μ M y 3,0 μ M, respectivamente. Se indujo la apoptosis en A375 por el tratamiento con PD184352 a una concentración superior a dicha concentración a la que se inhibió completamente la fosforilación de ERK, que se consideró que resultó del hecho de que PD184352 a una alta concentración presenta efectos inhibidores sobre miembros de la familia de MEK tales como MEK5 así como MEK1/2, es decir, que fue causado por un factor distinto de la inhibición de la vía de señalización canónica de MAPK en la que participa MEK1/2. PD184352 no presentó ninguna influencia particular sobre la línea celular mutante APC DLD-1 a dicha concentración a la que se inhibió completamente la fosforilación de ERK, es decir, 10 μ M.

A continuación, el tratamiento con el inhibidor Raf sorafenib no proporcionó efectos inhibidores completos sobre la fosforilación de MEK y ERK en ninguna de las líneas celulares. Por tanto, se consideró imposible la evaluación de la actividad inductora de la apoptosis de sorafenib.

5 Los resultados revelaron que el inhibidor de la vía de señalización de MAPK, en particular, el inhibidor de la vía de señalización canónica de MAPK, tuvo actividad inductora de la apoptosis selectiva de células mutantes de β -catenina activa, al igual que con SMK-17.

Ejemplo 4

10 Los resultados de los Ejemplos 1 a 3 mostraron que la mutación activa de β -catenina fue un factor determinante de la sensibilidad para la inducción de apoptosis por el inhibidor de la vía de señalización de MAPK. En vista de lo anterior, se investigó la participación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en la inducción de apoptosis por SMK-17 por una prueba de pérdida de función.

15 La prueba de pérdida de función se realizó evaluando una influencia sobre la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 en células en las que se inactivó la vía de señalización de Wnt/ β -catenina por la inactivación de β -catenina o la expresión forzada de DN-TCF4. Se usaron las células sin la inactivación de β -catenina o la expresión forzada de DN-TCF4 como células de control.

20 Primero, se hizo un intento por realizar la inactivación de β -catenina por ARNip en la línea celular mutante de β -catenina activa HCT_116 en la que la apoptosis se indujo por el tratamiento con SMK-17. La inactivación se realizó por un método de transfección inversa. Las células se recogieron después de 24, 48, 72, 96 horas, y se detectó la cantidad de expresión de β -catenina por transferencia Western. Como resultado, se confirmó que la expresión de β -catenina disminuyó 48 horas después de la inactivación (panel A de la FIG. 4). A continuación, se evaluó la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 tratando las células con SMK-17 3,0 μ M 48 horas después de la inactivación y detección de una población sub-G1 usando un citómetro de flujo después de 48 horas.

Como resultado, se suprimió significativamente la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 en las células de inactivación por β -catenina en comparación con las células de control (panel B de la FIG. 4).

25 A continuación, DN-TCF4 se expresó forzosamente en la línea celular mutante de β -catenina activa HCT_116 para evaluar la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17. DN-TCF4 está siendo deficiente en aminoácidos en las posiciones 1 a 31 del sitio de unión a ADN de TCF4, y por tanto, no se puede unir a ADN incluso cuando la β -catenina se una al mismo. Así, no se promueve la transcripción por TCF4 no mutante. Es decir, la vía de señalización de Wnt/ β -catenina puede ser llevada a un estado inactivado por la expresión forzada de DN-TCF4. Se usaron las células sin expresión forzada de DN-TCF4 como células de control.

30 Específicamente, del mismo modo que en el método de transfección de ARNip anteriormente mencionado, las células HCT_116 se transfectaron con DN-TCF4 y se evaluaron para la actividad transcripcional de TCF4 por un ensayo indicador TOPFLASH. TOPFLASH, en el que se inserta luciferasa de luciérnaga aguas abajo de la secuencia que se une a ADN de TCF4, expresa luciferasa de luciérnaga por la unión de TCF4. Así, se puede evaluar la actividad transcripcional de TCF4 por la cantidad de emisión de luz de luciérnaga. Además, para la corrección de la comparación entre líneas celulares, las células se transfectaron con un plásmido indicador de luciferasa de renilla, y se realizó la comparación entre líneas celulares usando un valor obtenido calculando la cantidad de emisión de luz de luciferasa de luciérnaga con respecto a la cantidad de emisión de luz de luciferasa de renilla constitutivamente expresada por un promotor de TK.

40 Como resultado del ensayo indicador TOPFLASH, se confirmó que se suprimió la actividad transcripcional de TCF4 por la expresión forzada de DN-TCF4 (panel A de la FIG. 5). A continuación, se evaluó la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 tratando las células con SMK-17 a una concentración de 10 μ M y detectando una población sub-G1 usando un citómetro de flujo después de 48 horas. Como resultado, se suprimió significativamente la inducción de la apoptosis por SMK-17 en las células en las que DN-TCF4 se expresó forzosamente en comparación con las células de control (panel B de la FIG. 5).

Ejemplo 5

50 Los resultados de los Ejemplos 1 a 3 mostraron que la mutación activa de β -catenina era un factor determinante de la sensibilidad para la inducción de la apoptosis por el inhibidor de la vía de señalización de MAPK. En vista de lo anterior, se investigó la participación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en la inducción de la apoptosis por SMK-17 por una prueba de ganancia de función.

En la prueba de ganancia de función, se usó la línea celular no mutante de β -catenina A375, cuya apoptosis no se indujo incluso cuando las células se trataron con SMK-17. Se activó la vía de señalización de Wnt/ β -catenina haciendo que la β -catenina activa se expresara forzosamente en las células, o estimulando las células con wnt3a que es un ligando para Fz, y se evaluó su influencia sobre la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17.

Primero, se estimularon las células A375 con wnt3a. Wnt3a se une a Fz presente en una superficie de la membrana, e inhibe la fosforilación de GSK-3 mediante Axin, suprimiendo así la formación de un complejo que degrada β -catenina. Esto permite que se active la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Específicamente, las células A375 transfectadas con TOPFLASH y plásmidos indicadores de luciferasa de renilla se trataron con wnt3a (50 ng/ml) y se evaluaron para la actividad transcripcional de TCF4 después de 24 horas por un ensayo indicador TOPFLASH.

Como resultado, se encontró que la actividad transcripcional de TCF4 aumentó por la estimulación de wnt3a (panel A de la FIG. 6).

Además, las células estimuladas con wnt3a se trataron con SMK-17 (10 μ M), seguido por medición de la escisión de PARP después de 24 horas por transferencia Western, y evaluación de la actividad inductora de la apoptosis después de 48 horas detectando una población sub-G1 usando un citómetro de flujo. Se usaron las células A375 sin estimulación con wnt3a como células de control. Como resultado, no se observó la escisión de PARP en el caso de SMK-17 solo, mientras que la escisión de PARP se indujo en la condición de estimulación de wnt3a (panel B de la FIG. 6). Además, se promovió significativamente la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 en las células estimuladas con wnt3a en comparación con las células de control (panel C de la FIG. 6).

A continuación, se expresó forzosamente la β -catenina activa en las células A375 para evaluar la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17. Debido a que tiene mutaciones en un sitio de fosforilación de β -catenina, es decir, una sustitución de serina a alanina en la posición 37 (S37A) y una sustitución de serina a alanina en la posición 45 (S45A), la β -catenina activa que se expresa forzosamente entra en el núcleo para potenciar una señal sin ser fosforilada por el complejo, activando así la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Las células A375 se transfectaron con β -catenina activa para evaluar la actividad transcripcional de TCF4 por un ensayo indicador TOPFLASH. Se usaron las células A375 no transfectadas con β -catenina activa como células de control. Como resultado, se encontró que la actividad transcripcional de TCF4 aumentaba por la expresión forzada de β -catenina activa (panel A de la FIG. 7).

Además, las células se trataron con SMK-17 (10 μ M), y se evaluó la actividad inductora de la apoptosis después de 48 horas detectando una población sub-G1 usando un citómetro de flujo. Como resultado, se promovió significativamente la actividad inductora de la apoptosis de SMK-17 en las células en las que la β -catenina activa se expresó forzosamente en comparación con las células de control (panel B de la FIG. 7).

Tanto la prueba de pérdida de función como la prueba de ganancia de función del Ejemplo 4 y Ejemplo 5 sugirieron entonces que la vía de señalización de Wnt/ β -catenina estaba implicada en la inducción de la apoptosis selectiva de células mutantes de β -catenina activa por el inhibidor de MEK SMK-17.

Ejemplo 6

Se evaluó el efecto *in vivo* de SMK-17. Específicamente, se cultivaron *in vitro* células tumorales, y se recogieron usando tripsina EDTA y PBS el día del trasplante en ratones. Las células recogidas se resuspendieron a 1×10^8 células/ml en PBS, y se trasplantaron por vía subcutánea 0,1 ml de la suspensión de células en la región axilar de ratones Balb/c-nu/nu (CLEA Japan, Inc.). Después de la confirmación del injerto de tumor en los ratones, se administró por vía oral a los ratones a una dosis prevista un líquido para administración en el que un compuesto de prueba se suspendió en una disolución acuosa a 0,5 % de MC (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y el volumen del tumor se midió en función del tiempo con un compás calibrador electrónico (fabricado por Mitutoyo Corporation).

Se midió el nivel de apoptosis de células tumorales en un tejido tumoral por un método de marcado de extremos cortados por dUTP-biotina mediado por TdT (TUNEL). Esta medición se realizó usando un kit de medición TUNEL comercialmente disponible (fabricado por CHEMICON) según el protocolo recomendado incluido con el kit.

Como se muestra en la FIG. 8, SMK-17 presentó un efecto de regresión tumoral *in vivo*. Específicamente, se observó una disminución en el volumen del tumor en los ratones sin pelo que portaban la línea de células tumorales SW48 que tenía una mutación activa de β -catenina, cuando SMK-17 a 200 mg/kg se administró por vía oral a los ratones. Similarmente, se observó una disminución en el volumen del tumor en los ratones sin pelo que portaban la línea de células tumorales colo205 que tenían una mutación activa de β -catenina, cuando SMK-17 a 200 mg/kg se administró a los ratones.

Por otra parte, se observó un efecto supresor sobre un aumento en el volumen del tumor, pero no se encontró efecto de la regresión tumoral en los ratones sin pelo que portaban la línea de células tumorales A375 o HT29 que tenían β -catenina no mutante, cuando SMK-17 se administró a 200 mg/kg a los ratones.

Además, se encontró que el número de células positivas para apoptosis en un tejido tumoral aumentó en los ratones sin pelo que llevaban las células SW48, cuando SMK-17 se administró a los ratones (FIG. 9). Por otra parte, no se observó cambio en el número de células positivas para apoptosis en un tejido tumoral en los ratones sin pelo que portaban las células A375 o células HT29, incluso cuando SMK-17 se administró a los ratones.

Los resultados revelaron que SMK-17 presentó un efecto de regresión sobre el tumor que tiene una mutación activa de β -catenina *in vivo*, y el efecto de regresión tumoral fue debido a un efecto inductor sobre la apoptosis de las células tumorales.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- 5 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona un método de predicción de la sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK, y un método de selección de un paciente que se determina que tiene alta sensibilidad a la administración de un fármaco que contiene el compuesto, y así permite que una enfermedad de cáncer sea eficazmente tratada con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK. Así, la presente invención es extremadamente útil en el campo terapéutico de un paciente con cáncer.
- 10

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1: Gen que codifica β -catenina no mutante (SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 3: ARNip usado para inactivar el gen de β -catenina.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> DAIICHI SANKYO COMPANY LIMITED

<120> Un método de predicción de una respuesta a un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK

- 20 <130> GP13-1015PCT

<150>JP P2013-036759

<151> 27-02-2013

- 25 <160> 3

<170>PatentIn versión 3.1

<210> 1

- 30 <211> 2346

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

- 35 <221> CDS

<222> (1) ..(2346)

<223>

<220>

- 40 <221>característica_misc

ES 2 703 208 T3

<223> gen que codifica una beta-catenina (SEQ ID NO: 2)

<400> 1

atg gct act caa gct gat ttg atg gag ttg gac atg gcc atg gaa cca	48
Met Ala Thr Gln Ala Asp Leu Met Glu Leu Asp Met Ala Met Glu Pro	
1 5 10 15	
gac aga aaa gcg gct gtt agt cac tgg cag caa cag tct tac ctg gac	96
Asp Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp Gln Gln Gln Ser Tyr Leu Asp	
20 25 30	
tct gga atc cat tct ggt gcc act acc aca gct cct tct ctg agt ggt	144
Ser Gly Ile His Ser Gly Ala Thr Thr Thr Ala Pro Ser Leu Ser Gly	
35 40 45	
aaa ggc aat cct gag gaa gag gat gtg gat acc tcc caa gtc ctg tat	192
Lys Gly Asn Pro Glu Glu Glu Asp Val Asp Thr Ser Gln Val Leu Tyr	
50 55 60	
gag tgg gaa cag gga ttt tct cag tcc ttc act caa gaa caa gta gct	240
Glu Trp Glu Gln Gly Phe Ser Gln Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Ala	
65 70 75 80	
gat att gat gga cag tat gca atg act cga gct cag agg gta cga gct	288
Asp Ile Asp Gly Gln Tyr Ala Met Thr Arg Ala Gln Arg Val Arg Ala	
85 90 95	
gct atg ttc cct gag aca tta gat gag ggc atg cag atc cca tct aca	336
Ala Met Phe Pro Glu Thr Leu Asp Glu Gly Met Gln Ile Pro Ser Thr	
100 105 110	
cag ttt gat gct gct cat ccc act aat gtc cag cgt ttg gct gaa cca	384
Gln Phe Asp Ala Ala His Pro Thr Asn Val Gln Arg Leu Ala Glu Pro	
115 120 125	

ES 2 703 208 T3

tca cag atg ctg aaa cat gca gtt gta aac ttg att aac tat caa gat	432
Ser Gln Met Leu Lys His Ala Val Val Asn Leu Ile Asn Tyr Gln Asp	
130 135 140	
gat gca gaa ctt gcc aca cgt gca atc cct gaa ctg aca aaa ctg cta	480
Asp Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Thr Lys Leu Leu	
145 150 155 160	
aat gac gag gac cag gtg gtg gtt aat aag gct gca gtt atg gtc cat	528
Asn Asp Glu Asp Gln Val Val Val Asn Lys Ala Ala Val Met Val His	
165 170 175	
cag ctt tct aaa aag gaa gct tcc aga cac gct atc atg cgt tct cct	576
Gln Leu Ser Lys Lys Glu Ala Ser Arg His Ala Ile Met Arg Ser Pro	
180 185 190	
cag atg gtg tct gct att gta cgt acc atg cag aat aca aat gat gta	624
Gln Met Val Ser Ala Ile Val Arg Thr Met Gln Asn Thr Asn Asp Val	
195 200 205	
gaa aca gct cgt tgt acc gct ggg acc ttg cat aac ctt tcc cat cat	672
Glu Thr Ala Arg Cys Thr Ala Gly Thr Leu His Asn Leu Ser His His	
210 215 220	
cgt gag ggc tta ctg gcc atc ttt aag tct gga ggc att cct gcc ctg	720
Arg Glu Gly Leu Leu Ala Ile Phe Lys Ser Gly Gly Ile Pro Ala Leu	
225 230 235 240	
gtg aaa atg ctt ggt tca cca gtg gat tct gtg ttg ttt tat gcc att	768
Val Lys Met Leu Gly Ser Pro Val Asp Ser Val Leu Phe Tyr Ala Ile	
245 250 255	
aca act ctc cac aac ctt tta tta cat caa gaa gga gct aaa atg gca	816
Thr Thr Leu His Asn Leu Leu Leu His Gln Glu Gly Ala Lys Met Ala	
260 265 270	
gtg cgt tta gct ggt ggg ctg cag aaa atg gtt gcc ttg ctc aac aaa	864
Val Arg Leu Ala Gly Gly Leu Gln Lys Met Val Ala Leu Leu Asn Lys	
275 280 285	
aca aat gtt aaa ttc ttg gct att acg aca gac tgc ctt caa att tta	912
Thr Asn Val Lys Phe Leu Ala Ile Thr Thr Asp Cys Leu Gln Ile Leu	
290 295 300	
gct tat ggc aac caa gaa agc aag ctc atc ata ctg gct agt ggt gga	960
Ala Tyr Gly Asn Gln Glu Ser Lys Leu Ile Ile Leu Ala Ser Gly Gly	
305 310 315 320	
ccc caa gct tta gta aat ata atg agg acc tat act tac gaa aaa cta	1008
Pro Gln Ala Leu Val Asn Ile Met Arg Thr Tyr Thr Tyr Glu Lys Leu	
325 330 335	
ctg tgg acc aca agc aga gtg ctg aag gtg cta tct gtc tgc tct agt	1056
Leu Trp Thr Thr Ser Arg Val Leu Lys Val Leu Ser Val Cys Ser Ser	
340 345 350	
aat aag ccg gct att gta gaa gct ggt gga atg caa gct tta gga ctt	1104
Asn Lys Pro Ala Ile Val Glu Ala Gly Gly Met Gln Ala Leu Gly Leu	
355 360 365	
cac ctg aca gat cca agt caa cgt ctt gtt cag aac tgt ctt tgg act	1152
His Leu Thr Asp Pro Ser Gln Arg Leu Val Gln Asn Cys Leu Trp Thr	

ES 2 703 208 T3

370		375		380												
ctc	agg	aat	ctt	tca	gat	gct	gca	act	aaa	cag	gaa	ggg	atg	gaa	ggt	1200
Leu	Arg	Asn	Leu	Ser	Asp	Ala	Ala	Thr	Lys	Gln	Glu	Gly	Met	Glu	Gly	
385					390					395					400	
ctc	ctt	ggg	act	ctt	ggt	cag	ctt	ctg	ggt	tca	gat	gat	ata	aat	gtg	1248
Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Val	Gln	Leu	Leu	Gly	Ser	Asp	Asp	Ile	Asn	Val	
				405					410					415		
gtc	acc	tgt	gca	gct	gga	att	ctt	tct	aac	ctc	act	tgc	aat	aat	tat	1296
Val	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Ile	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Cys	Asn	Asn	Tyr	
			420					425					430			
aag	aac	aag	atg	atg	gtc	tgc	caa	gtg	ggt	ggt	ata	gag	gct	ctt	gtg	1344
Lys	Asn	Lys	Met	Met	Val	Cys	Gln	Val	Gly	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Val	
		435					440					445				
cgt	act	gtc	ctt	cgg	gct	ggt	gac	agg	gaa	gac	atc	act	gag	cct	gcc	1392
Arg	Thr	Val	Leu	Arg	Ala	Gly	Asp	Arg	Glu	Asp	Ile	Thr	Glu	Pro	Ala	
	450					455					460					
atc	tgt	gct	ctt	cgt	cat	ctg	acc	agc	cga	cac	caa	gaa	gca	gag	atg	1440
Ile	Cys	Ala	Leu	Arg	His	Leu	Thr	Ser	Arg	His	Gln	Glu	Ala	Glu	Met	
465					470					475					480	
gcc	cag	aat	gca	ggt	cgc	ctt	cac	tat	gga	cta	cca	ggt	gtg	ggt	aag	1488
Ala	Gln	Asn	Ala	Val	Arg	Leu	His	Tyr	Gly	Leu	Pro	Val	Val	Val	Lys	
			485						490					495		
ctc	tta	cac	cca	cca	tcc	cac	tgg	cct	ctg	ata	aag	gct	act	ggt	gga	1536
Leu	Leu	His	Pro	Pro	Ser	His	Trp	Pro	Leu	Ile	Lys	Ala	Thr	Val	Gly	
			500					505					510			
ttg	att	cga	aat	ctt	gcc	ctt	tgt	ccc	gca	aat	cat	gca	cct	ttg	cgt	1584
Leu	Ile	Arg	Asn	Leu	Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Asn	His	Ala	Pro	Leu	Arg	
		515					520					525				
gag	cag	ggt	gcc	att	cca	cga	cta	ggt	cag	ttg	ctt	ggt	cgt	gca	cat	1632
Glu	Gln	Gly	Ala	Ile	Pro	Arg	Leu	Val	Gln	Leu	Val	Val	Arg	Ala	His	
	530					535					540					
cag	gat	acc	cag	cgc	cgt	acg	tcc	atg	ggt	ggg	aca	cag	cag	caa	ttt	1680
Gln	Asp	Thr	Gln	Arg	Arg	Thr	Ser	Met	Gly	Gly	Thr	Gln	Gln	Gln	Phe	
545					550					555					560	
gtg	gag	ggg	gtc	cgc	atg	gaa	gaa	ata	ggt	gaa	ggt	tgt	acc	gga	gcc	1728
Val	Glu	Gly	Val	Arg	Met	Glu	Glu	Ile	Val	Glu	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	
			565					570						575		
ctt	cac	atc	cta	gct	cgg	gat	ggt	cac	aac	cga	att	ggt	atc	aga	gga	1776
Leu	His	Ile	Leu	Ala	Arg	Asp	Val	His	Asn	Arg	Ile	Val	Ile	Arg	Gly	
			580					585					590			
cta	aat	acc	att	cca	ttg	ttt	gtg	cag	ctg	ctt	tat	tct	ccc	att	gaa	1824
Leu	Asn	Thr	Ile	Pro	Leu	Phe	Val	Gln	Leu	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Glu	
		595					600					605				
aac	atc	caa	aga	gta	gct	gca	ggg	gtc	ctc	tgt	gaa	ctt	gct	cag	gac	1872
Asn	Ile	Gln	Arg	Val	Ala	Ala	Gly	Val	Leu	Cys	Glu	Leu	Ala	Gln	Asp	
	610					615					620					
aag	gaa	gct	gca	gaa	gct	att	gaa	gct	gag	gga	gcc	aca	gct	cct	ctg	1920

ES 2 703 208 T3

Lys Glu Ala Ala Glu Ala Ile Glu Ala Glu Gly Ala Thr Ala Pro Leu
625 630 635 640

aca gag tta ctt cac tct agg aat gaa ggt gtg gcg aca tat gca gct 1968
Thr Glu Leu Leu His Ser Arg Asn Glu Gly Val Ala Thr Tyr Ala Ala
645 650 655

gct gtt ttg ttc cga atg tct gag gac aag cca caa gat tac aag aaa 2016
Ala Val Leu Phe Arg Met Ser Glu Asp Lys Pro Gln Asp Tyr Lys Lys
660 665 670

cgg ctt tca gtt gag ctg acc agc tct ctc ttc aga aca gag cca atg 2064
Arg Leu Ser Val Glu Leu Thr Ser Ser Leu Phe Arg Thr Glu Pro Met
675 680 685

gct tgg aat gag act gct gat ctt gga ctt gat att ggt gcc cag gga 2112
Ala Trp Asn Glu Thr Ala Asp Leu Gly Leu Asp Ile Gly Ala Gln Gly
690 695 700

gaa ccc ctt gga tat cgc cag gat gat cct agc tat cgt tct ttt cac 2160
Glu Pro Leu Gly Tyr Arg Gln Asp Asp Pro Ser Tyr Arg Ser Phe His
705 710 715 720

tct ggt gga tat ggc cag gat gcc ttg ggt atg gac ccc atg atg gaa 2208
Ser Gly Gly Tyr Gly Gln Asp Ala Leu Gly Met Asp Pro Met Met Glu
725 730 735

cat gag atg ggt ggc cac cac cct ggt gct gac tat cca gtt gat ggg 2256
His Glu Met Gly Gly His His Pro Gly Ala Asp Tyr Pro Val Asp Gly
740 745 750

ctg cca gat ctg ggg cat gcc cag gac ctc atg gat ggg ctg cct cca 2304
Leu Pro Asp Leu Gly His Ala Gln Asp Leu Met Asp Gly Leu Pro Pro
755 760 765

ggt gac agc aat cag ctg gcc tgg ttt gat act gac ctg taa 2346
Gly Asp Ser Asn Gln Leu Ala Trp Phe Asp Thr Asp Leu
770 775 780

<210> 2

<211> 781

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Thr Gln Ala Asp Leu Met Glu Leu Asp Met Ala Met Glu Pro
1 5 10 15

Asp Arg Lys Ala Ala Val Ser His Trp Gln Gln Gln Ser Tyr Leu Asp
20 25 30

Ser Gly Ile His Ser Gly Ala Thr Thr Thr Ala Pro Ser Leu Ser Gly
35 40 45

Lys Gly Asn Pro Glu Glu Glu Asp Val Asp Thr Ser Gln Val Leu Tyr
50 55 60

10

ES 2 703 208 T3

Glu Trp Glu Gln Gly Phe Ser Gln Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Ala
 65 70 75 80

Asp Ile Asp Gly Gln Tyr Ala Met Thr Arg Ala Gln Arg Val Arg Ala
 85 90 95

Ala Met Phe Pro Glu Thr Leu Asp Glu Gly Met Gln Ile Pro Ser Thr
 100 105 110

Gln Phe Asp Ala Ala His Pro Thr Asn Val Gln Arg Leu Ala Glu Pro
 115 120 125

Ser Gln Met Leu Lys His Ala Val Val Asn Leu Ile Asn Tyr Gln Asp
 130 135 140

Asp Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Thr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asp Glu Asp Gln Val Val Val Asn Lys Ala Ala Val Met Val His
 165 170 175

Gln Leu Ser Lys Lys Glu Ala Ser Arg His Ala Ile Met Arg Ser Pro
 180 185 190

Gln Met Val Ser Ala Ile Val Arg Thr Met Gln Asn Thr Asn Asp Val
 195 200 205

Glu Thr Ala Arg Cys Thr Ala Gly Thr Leu His Asn Leu Ser His His
 210 215 220

Arg Glu Gly Leu Leu Ala Ile Phe Lys Ser Gly Gly Ile Pro Ala Leu
 225 230 235 240

Val Lys Met Leu Gly Ser Pro Val Asp Ser Val Leu Phe Tyr Ala Ile
 245 250 255

Thr Thr Leu His Asn Leu Leu Leu His Gln Glu Gly Ala Lys Met Ala
 260 265 270

Val Arg Leu Ala Gly Gly Leu Gln Lys Met Val Ala Leu Leu Asn Lys
 275 280 285

Thr Asn Val Lys Phe Leu Ala Ile Thr Thr Asp Cys Leu Gln Ile Leu
 290 295 300

Ala Tyr Gly Asn Gln Glu Ser Lys Leu Ile Ile Leu Ala Ser Gly Gly
 305 310 315 320

ES 2 703 208 T3

Pro Gln Ala Leu Val Asn Ile Met Arg Thr Tyr Thr Tyr Glu Lys Leu
 325 330 335

Leu Trp Thr Thr Ser Arg Val Leu Lys Val Leu Ser Val Cys Ser Ser
 340 345 350

Asn Lys Pro Ala Ile Val Glu Ala Gly Gly Met Gln Ala Leu Gly Leu
 355 360 365

His Leu Thr Asp Pro Ser Gln Arg Leu Val Gln Asn Cys Leu Trp Thr
 370 375 380

Leu Arg Asn Leu Ser Asp Ala Ala Thr Lys Gln Glu Gly Met Glu Gly
 385 390 395 400

Leu Leu Gly Thr Leu Val Gln Leu Leu Gly Ser Asp Asp Ile Asn Val
 405 410 415

Val Thr Cys Ala Ala Gly Ile Leu Ser Asn Leu Thr Cys Asn Asn Tyr
 420 425 430

Lys Asn Lys Met Met Val Cys Gln Val Gly Gly Ile Glu Ala Leu Val
 435 440 445

Arg Thr Val Leu Arg Ala Gly Asp Arg Glu Asp Ile Thr Glu Pro Ala
 450 455 460

Ile Cys Ala Leu Arg His Leu Thr Ser Arg His Gln Glu Ala Glu Met
 465 470 475 480

Ala Gln Asn Ala Val Arg Leu His Tyr Gly Leu Pro Val Val Val Lys
 485 490 495

Leu Leu His Pro Pro Ser His Trp Pro Leu Ile Lys Ala Thr Val Gly
 500 505 510

Leu Ile Arg Asn Leu Ala Leu Cys Pro Ala Asn His Ala Pro Leu Arg
 515 520 525

Glu Gln Gly Ala Ile Pro Arg Leu Val Gln Leu Leu Val Arg Ala His
 530 535 540

Gln Asp Thr Gln Arg Arg Thr Ser Met Gly Gly Thr Gln Gln Gln Phe
 545 550 555 560

Val Glu Gly Val Arg Met Glu Glu Ile Val Glu Gly Cys Thr Gly Ala
 565 570 575

ES 2 703 208 T3

Leu His Ile Leu Ala Arg Asp Val His Asn Arg Ile Val Ile Arg Gly
 580 585 590

Leu Asn Thr Ile Pro Leu Phe Val Gln Leu Leu Tyr Ser Pro Ile Glu
 595 600 605

Asn Ile Gln Arg Val Ala Ala Gly Val Leu Cys Glu Leu Ala Gln Asp
 610 615 620

Lys Glu Ala Ala Glu Ala Ile Glu Ala Glu Gly Ala Thr Ala Pro Leu
 625 630 635 640

Thr Glu Leu Leu His Ser Arg Asn Glu Gly Val Ala Thr Tyr Ala Ala
 645 650 655

Ala Val Leu Phe Arg Met Ser Glu Asp Lys Pro Gln Asp Tyr Lys Lys
 660 665 670

Arg Leu Ser Val Glu Leu Thr Ser Ser Leu Phe Arg Thr Glu Pro Met
 675 680 685

Ala Trp Asn Glu Thr Ala Asp Leu Gly Leu Asp Ile Gly Ala Gln Gly
 690 695 700

Glu Pro Leu Gly Tyr Arg Gln Asp Asp Pro Ser Tyr Arg Ser Phe His
 705 710 715 720

Ser Gly Gly Tyr Gly Gln Asp Ala Leu Gly Met Asp Pro Met Met Glu
 725 730 735

His Glu Met Gly Gly His His Pro Gly Ala Asp Tyr Pro Val Asp Gly
 740 745 750

Leu Pro Asp Leu Gly His Ala Gln Asp Leu Met Asp Gly Leu Pro Pro
 755 760 765

Gly Asp Ser Asn Gln Leu Ala Trp Phe Asp Thr Asp Leu
 770 775 780

<210> 3

<211> 25

5

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> ARNip usado en inactivar el gen de beta-catenina

10

<400> 3

auuacuagagcagacagauagcacc 25

REIVINDICACIONES

1. Un método de selección de un paciente para someterse al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (abreviada en lo sucesivo MAPK), que comprende:
- 5 usar una muestra biológica derivada de un paciente con cáncer, medir si la β -catenina contenida en la muestra biológica tiene o no al menos un tipo de mutación seleccionada del grupo que consiste en S33Y, S33C, S33F, S37F, S37P, T41A, S45del, S45F, S45P y N287S; y
- seleccionar un paciente que se detecta que tiene la mutación en β -catenina como paciente para someterse al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK.
- 10 2. Un método de predicción de la sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK, que comprende:
- usar muestra biológica derivada de un paciente con cáncer, medir si la β -catenina contenida en la muestra biológica tiene o no al menos un tipo de mutación seleccionada del grupo que consiste en S33Y, S33C, S33F, S37F, S37P, T41A, S45del, S45F, S45P y N287S; y
- 15 determinar que un paciente que se detecta que tiene la mutación en β -catenina tiene sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK.
3. El método según la reivindicación 2, en el que la sensibilidad al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es la regresión del cáncer debido a la inducción de apoptosis en el tratamiento de la enfermedad de cáncer con el compuesto.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra biológica es una muestra biológica que contiene una célula cancerosa o un tejido canceroso.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto que inhibe una MAPK cinasa cinasa (abreviada en lo sucesivo MAPKKK), un compuesto que inhibe una MAPK cinasa (abreviada en lo sucesivo MAPKK) y un compuesto que inhibe una MAPK.
- 25 6. El método según la reivindicación 5, en el que el al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto que inhibe una MAPKKK, un compuesto que inhibe una MAPKK y un compuesto que inhibe una MAPK es al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto que inhibe B-Raf y un compuesto que inhibe MEK1/2.
- 30 7. Un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad de cáncer, comprendiendo el método:
- usar una muestra biológica derivada de un paciente con cáncer, medir si la β -catenina contenida en la muestra biológica tiene o no al menos un tipo de mutación seleccionada del grupo que consiste en S33Y, S33C, S33F, S37F, S37P, T41A, S45del, S45F, S45P y N287S;
- 35 seleccionar un paciente que se detecta que tiene la mutación en β -catenina como paciente para someterse al tratamiento de la enfermedad de cáncer con un compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK; y
- administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK al paciente seleccionado;
- en el que el compuesto que inhibe una vía de señalización de MAPK es SMK-17.
- 40 8. El compuesto para su uso según la reivindicación 7, en el que la muestra biológica es una muestra biológica que contiene una célula cancerosa o un tejido canceroso.

Figura 1

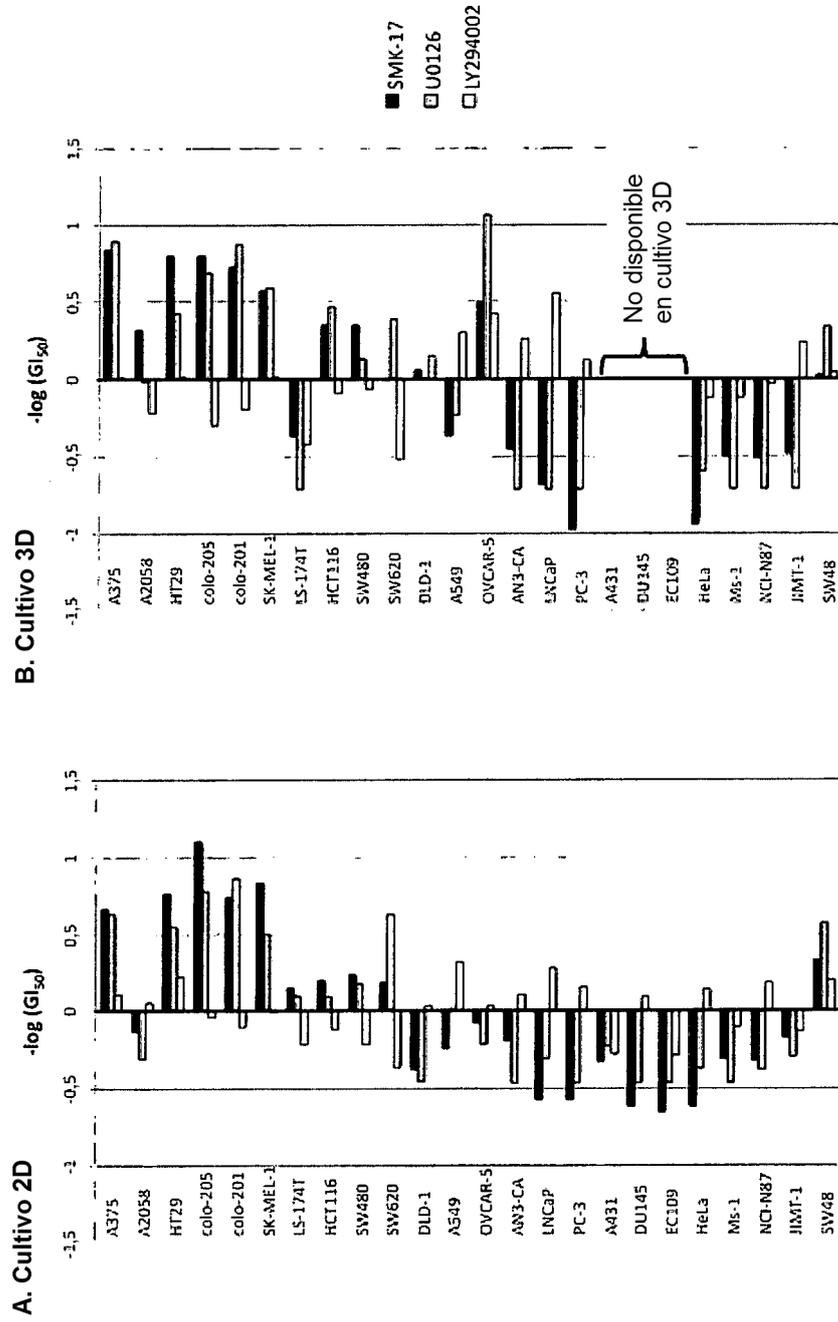


Figura 2

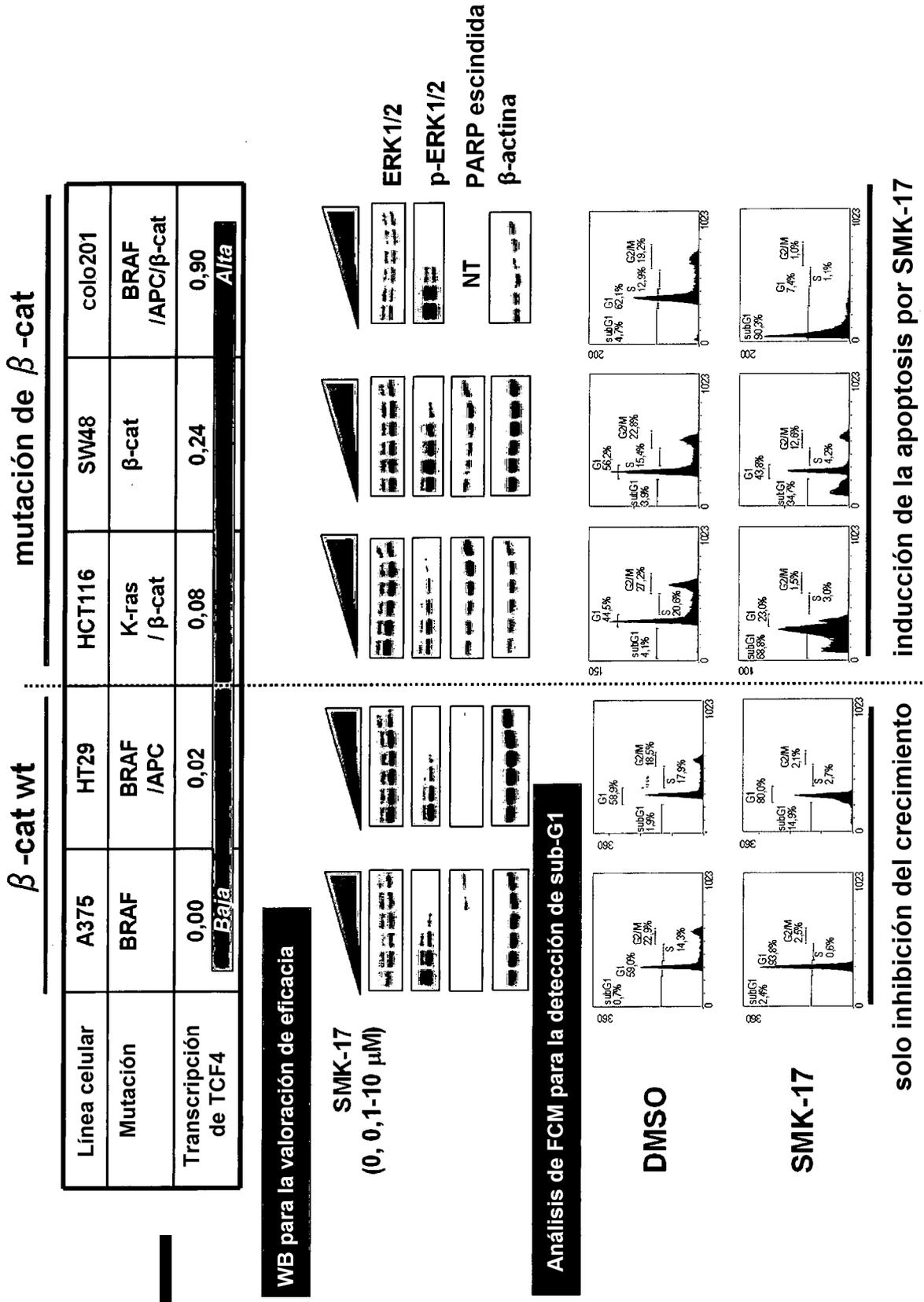


Figura 3

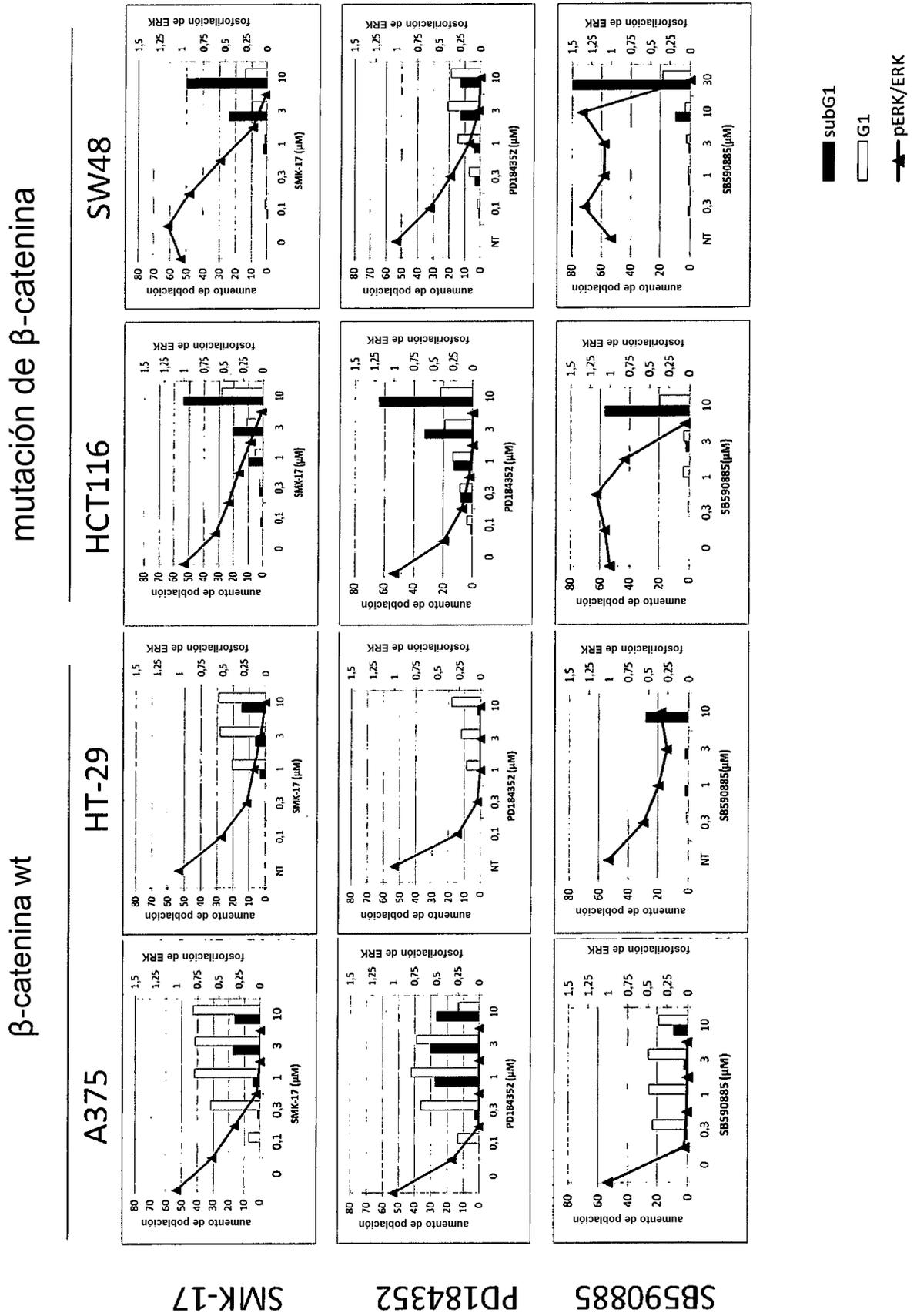


Figura 4

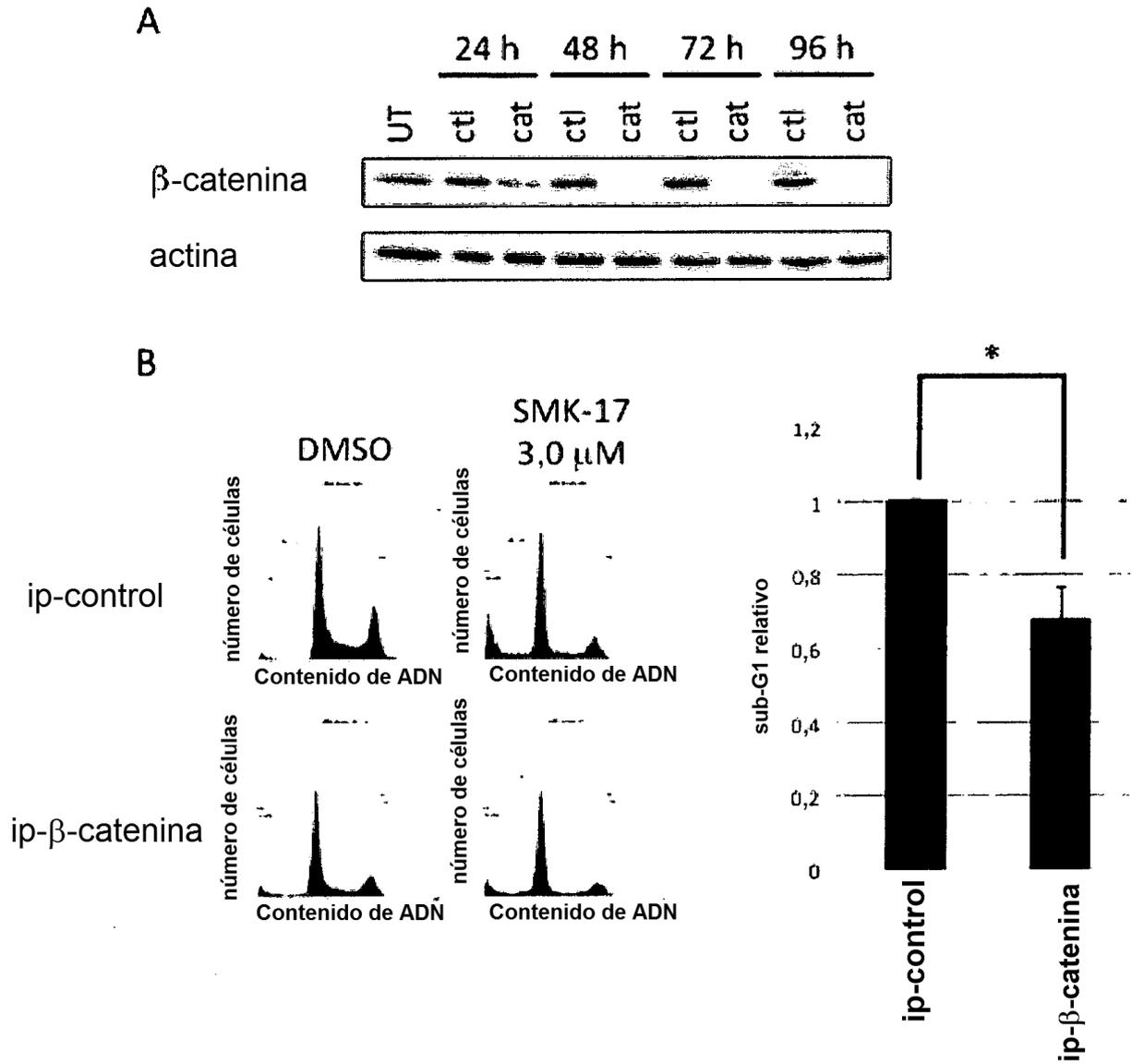


Figura 5

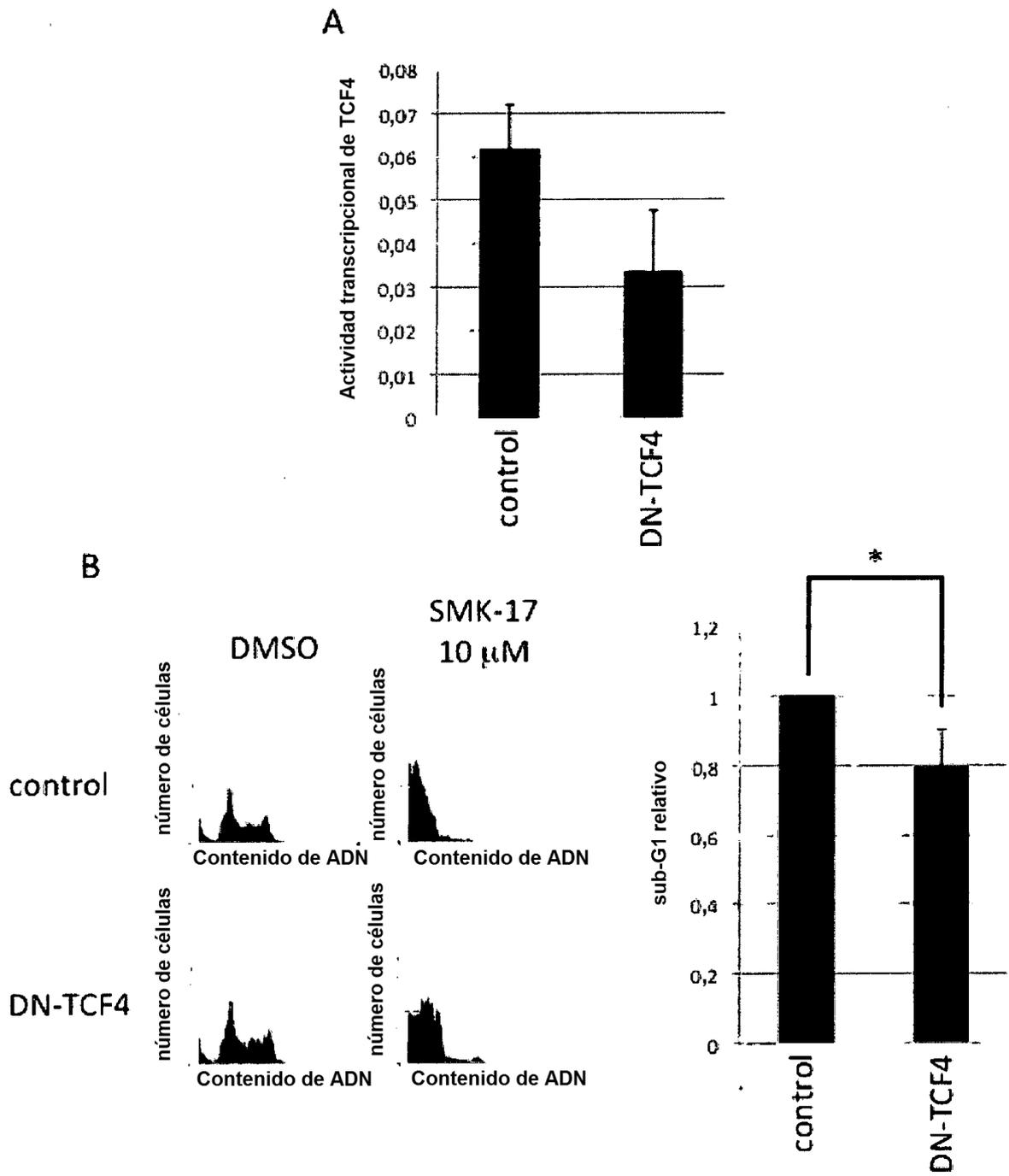


Figura 6

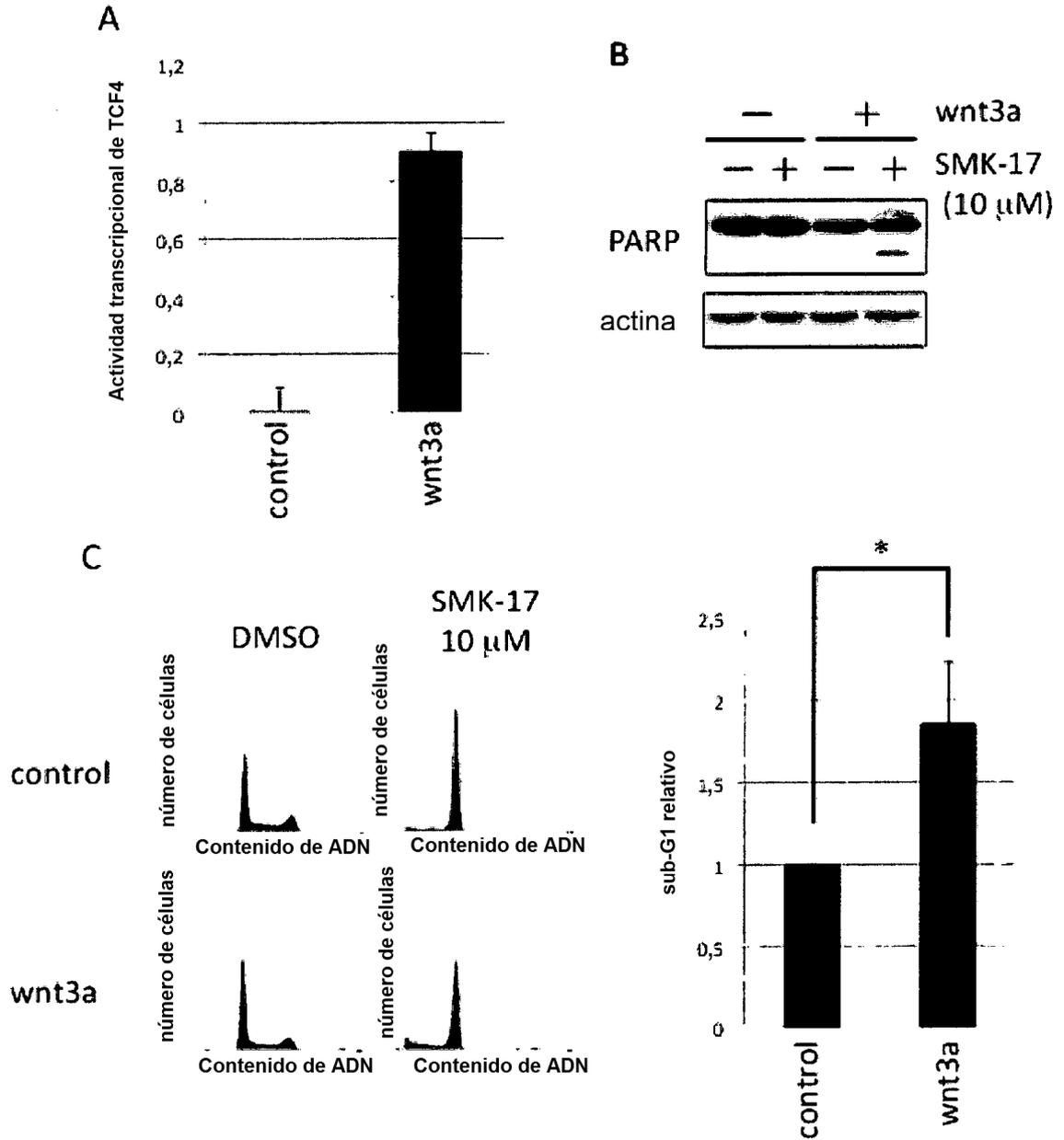


Figura 7

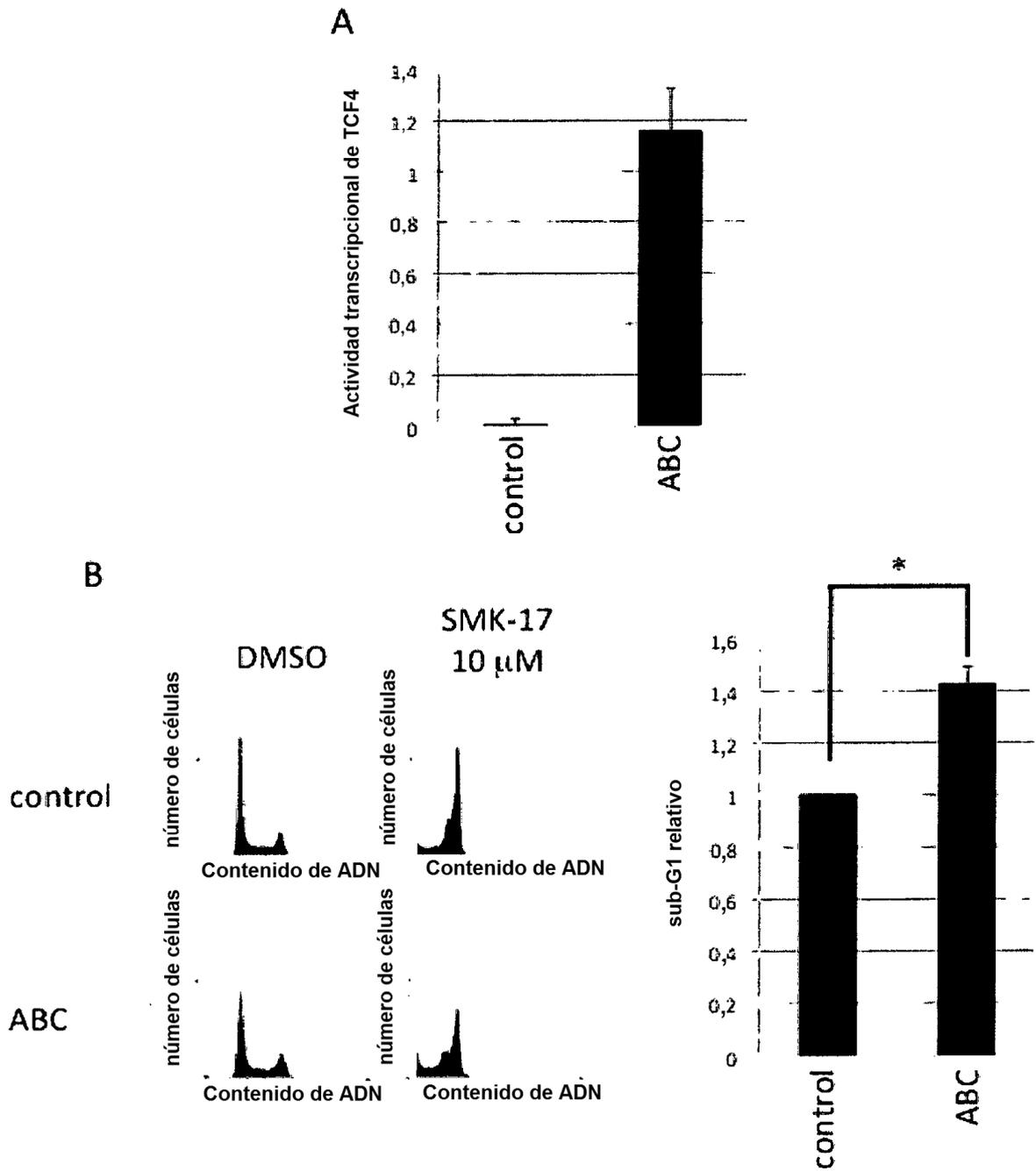


Figura 8

β -cat wt mutación de β -cat

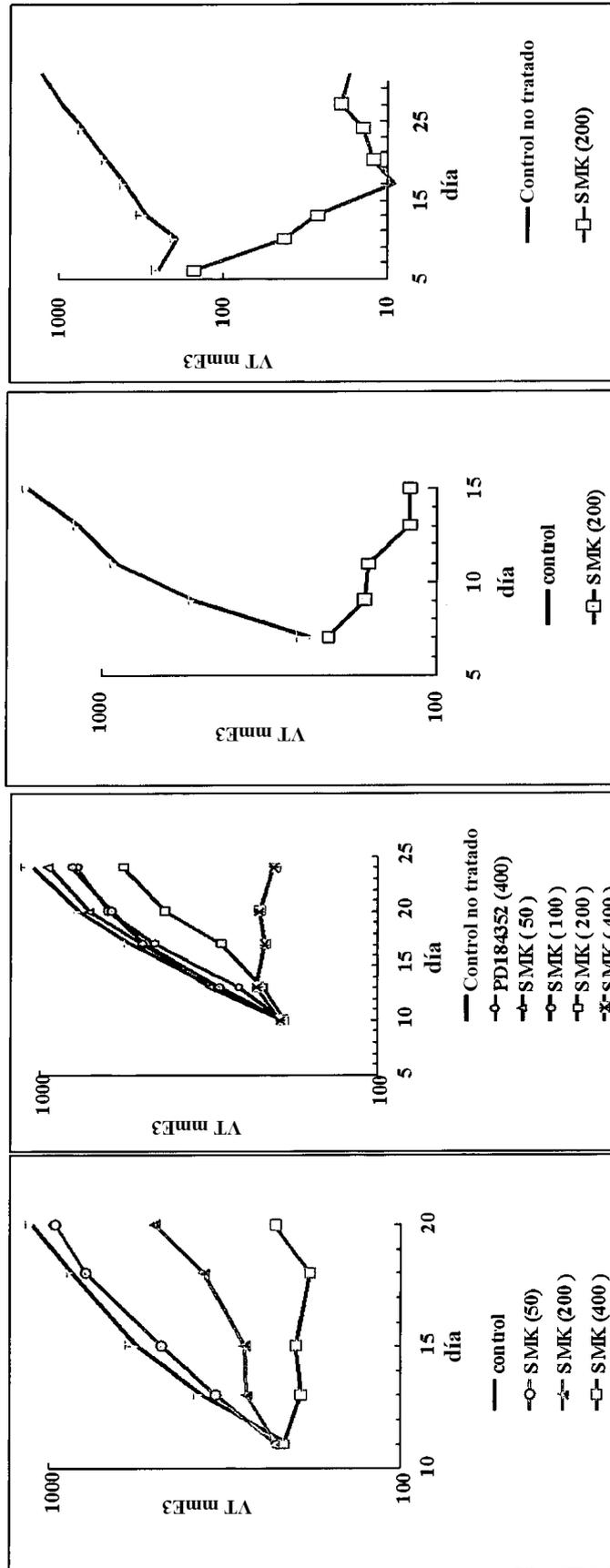


Figura 9

