

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 999**

51 Int. Cl.:

G01N 33/566	(2006.01)	G01N 33/574	(2006.01)
C07D 277/04	(2006.01)	G01N 33/68	(2006.01)
C07D 277/82	(2006.01)	A61K 31/4439	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 31/337	(2006.01)	C12Q 1/6886	(2008.01)
A61K 31/4745	(2006.01)		
A61K 31/497	(2006.01)		
A61K 31/704	(2006.01)		
C12Q 1/68	(2008.01)		
G01N 33/50	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2012 PCT/US2012/065923**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13078145**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2012 E 12851702 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2783217**

54 Título: **Biomarcadores para cánceres que responden a moduladores de la actividad de Hec1**

30 Prioridad:

21.11.2011 US 201161562177 P

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

09.01.2020

73 Titular/es:

**TAIVEX THERAPEUTICS CORPORATION
(100.0%)
8F., No. 12, Dongxing Rd., Songshan Dist.
Taipei City 105, TW**

72 Inventor/es:

**HUANG, YU-LING y
LAU, JOHNSON**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 736 999 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores para cánceres que responden a moduladores de la actividad de Hec1

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense en tramitación junto con la presente con el número de serie 61/562.177, presentada el 21 de noviembre de 2011.

5 Campo de la invención

El campo de la invención es la identificación y el uso de biomarcadores para determinar la sensibilidad de enfermedades proliferativas a agentes terapéuticos dirigidos a nivel molecular, y en particular inhibidores de Hec1 en combinación con un agente citotóxico.

Antecedentes de la invención

10 Se espera que se produzcan más de 1,6 millones de nuevos diagnósticos de cáncer y aproximadamente 580.000 muertes por cáncer en los Estados Unidos en 2012. Actualmente, el cáncer es la segunda causa de muerte más común en los Estados Unidos, detrás de la causa principal, la enfermedad cardíaca. Si bien se han desarrollado diversos tratamientos nuevos para el cáncer durante la última década, la tasa de supervivencia relativa de cinco años para todos los cánceres diagnosticados entre 1999 y 2006 es del 68%, con una mortalidad estimada del 28% y el 26% para el cáncer de pulmón en hombres y mujeres, respectivamente, el 15% para el cáncer de mama en mujeres, y el 11% para el cáncer de próstata. Tales estadísticas reflejan una necesidad crítica de avances adicionales en los tratamientos disponibles.

La medicina personalizada ha revolucionado el proceso de prueba y error del tratamiento médico actual y ha mejorado las tasas de respuesta del paciente utilizando perfiles de biomarcadores para predecir con mayor eficacia la respuesta de un paciente a un medicamento y reducir el tiempo empleado en el tratamiento ineficaz que permite que la enfermedad avance. Al menos en determinados casos, un enfoque de este tipo ha permitido un tratamiento más específico y, por lo tanto, más eficaz, destacando el beneficio potencial del uso de biomarcadores en la personalización de las pautas de administración de tratamiento de pacientes para aumentar las tasas de éxito de la terapia.

25 Por ejemplo, en la 47ª Reunión anual de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (junio de 2011), Tsimberidou *et al* del MD Anderson Cancer Center presentó un estudio que describe el éxito de los las pautas de administración de tratamiento dirigidos a PIK3CA, mTOR, BRAF, MEK, multincinasas, KIT o EGFR en 175 pacientes con una anomalía genética. Este estudio mostró que la tasa de respuesta fue del 27% con la terapia dirigida emparejada frente al 5% observada para los pacientes tratados con terapia no emparejada. Otros marcadores con al menos algún éxito para mejorar el resultado del tratamiento para su uso en medicina personalizada se describieron por Duffy and Crown (Clinical Chemistry, 2008, 54 (11): 1770-1779). Este y todos los demás materiales extrínsecos comentados en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. Cuando una definición o uso de un término en una referencia incorporada es incoherente o contraria a la definición de ese término proporcionado en el presente documento, la definición de ese término proporcionada en el presente documento se aplica y la definición de ese término en la referencia no se aplica.

La segregación cromosómica defectuosa y la proliferación mitótica no controlada son características de la enfermedad neoplásica. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de un número creciente de marcadores de cáncer, sigue habiendo una falta de marcadores indicativos de susceptibilidad a los fármacos que se dirigen a la regulación del huso y del cinetocoro o al control del punto de control mitótico. Hec1, por ejemplo, es un componente crítico en la señalización del punto de control del huso que se expresa altamente en el cáncer y ayuda a asegurar la correcta segregación de los cromosomas durante la división celular. Recientemente se han informado varios inhibidores de Hec1 potencialmente potentes (véase, por ejemplo, el documento WO 2011/115998 de Lau and Huang; Qiu *et al* en J. Med. Chem., 2009, 52 (6): 1757-1767; Wu *et al* en Cancer Res., 15 de octubre de 2008, 68 (20): 8393-9). Si bien al menos algunos de los compuestos han mostrado resultados prometedores, no hay, sin embargo, ninguna guía en cuanto a ningún biomarcador que sea indicativo de un mayor éxito del tratamiento con tales compuestos.

El documento US 2006/140956 A1 da a conocer métodos y compuestos para inhibir la actividad de Hec1 para el tratamiento de enfermedades que implican hiperproliferación celular, por ejemplo cáncer. Además, el documento US 2006/140956 A1 describe métodos de identificación de compuestos para inhibir la actividad de Hec1.

50 Por tanto, todavía existe la necesidad de biomarcadores para cánceres que responden a moduladores de la actividad de Hec1.

Sumario de la invención

El objeto de la invención se dirige a biomarcadores e inhibidores de Hec1 para su uso en métodos relacionados con el tratamiento de enfermedades neoplásicas, donde la enfermedad se trata con un inhibidor de Hec1. Más específicamente, los inventores han descubierto ahora que el estado y/o el nivel de expresión de Hec1 (HEC), Rb

(RB1) y p53 (TP53) pueden usarse como biomarcadores predictivos para el tratamiento de diversos estados patológicos en los que se trata la enfermedad con un inhibidor de Hec1, donde el estado es con respecto al genotipo silvestre frente al mutante y/o la expresión de genes deficiente/ausente.

5 Por tanto, en el objeto de la invención, se usa la identificación de perfiles de biomarcadores para determinar la sensibilidad de enfermedades proliferativas tales como cáncer a inhibidores de Hec1. Por tanto, se contempla que un método de determinación de la sensibilidad de una enfermedad proliferativa y/o una célula neoplásica en un sujeto al tratamiento con un inhibidor de Hec1 incluye una etapa de determinación del estado y/o los niveles de expresión de Hec1(HEC), Rb(RB1) y p53 (TP53) en una muestra derivada del sujeto. Tal determinación puede incluir formar un complejo detectable que proporciona un resultado de prueba. El resultado de prueba se compara con el resultado de referencia en relación con un estado y/o niveles de expresión de Hec1(HEC), Rb(RB1) y p53 (TP53).

15 Además, se da a conocer en el presente documento un método de selección de un sujeto y/o evaluación de un paciente que padece una enfermedad proliferativa o neoplásica para el tratamiento con un inhibidor de Hec1 se contempla que incluye una etapa de determinación del estado y/o los niveles de expresión de uno o más de Hec1(HEC), Rb(RB1) y p53 (TP53) en una muestra derivada del sujeto. Tal determinación puede incluir formar un complejo detectable, y puede proporcionar un resultado de prueba. En algunas realizaciones, el resultado de prueba puede compararse con un resultado de referencia en relación con un estado y/o niveles de expresión de uno o más de Hec1 (HEC), Rb(RB1) y p53 (TP53) obtenidos de una célula de referencia para determinar la sensibilidad. Tal sensibilidad puede usarse para proporcionar un resultado de evaluación o selección.

20 En el concepto de la invención, se determinan los niveles de expresión de Hec1; un nivel de expresión aumentado es indicativo de sensibilidad de una célula neoplásica o proliferativa a un inhibidor de Hec 1. Además, se determina el estado de Rb y p53; delección de Rb y p53 o presencia de un Rb y p53 mutados indican sensibilidad de una célula neoplásica o proliferativa a un inhibidor de Hec1. Puede caracterizarse el estado y/o la expresión de Hec1, Rb y p53 mediante cuantificación de ácidos nucleicos que codifican para Hec1, Rb y/o p53, mediante secuenciación de ácidos nucleicos que codifican para Hec1, Rb y/o p53, mediante hibridación de ácidos nucleicos que codifican para Hec1, Rb y/o p53, o mediante una combinación de estos. Alternativamente, puede caracterizarse el estado y/o la expresión de Hec1, Rb y/o p53 mediante cuantificación y/o caracterización de secuencia de proteína Hec1, proteína Rb y proteína p53. En algunas realizaciones del concepto de la invención, pueden caracterizarse tanto el ácido nucleico como la proteína en relación con Hec1, Rb y/o p53.

30 El inhibidor de Hec1 se selecciona del grupo que consiste en, N-(4-(4-isopropoxi-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (100951); N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101001); 2-fluoro-N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101015); N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iloxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (Hec1 10091); N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110095); y N-(4-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110096).

40 En aún otra realización del objeto de la invención, se contempla que un inhibidor de Hec1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, en el que la enfermedad neoplásica contiene célula(s) neoplásica(s), incluye una etapa de determinación de un tipo molecular de la enfermedad neoplásica a partir de una muestra derivada del sujeto y determinación del tipo molecular de un nivel de expresión de Hec1, Rb y p53. Tal determinación incluye formar un complejo detectable, y puede proporcionar un resultado de evaluación. En una realización de este tipo, un nivel aumentado de expresión de Hec1 y delección o la presencia de una forma mutada de Rb y/ p53 en relación con un valor o resultado de referencia correspondiente es indicativo de la idoneidad de la enfermedad neoplásica del paciente con un inhibidor de Hec1. Las enfermedades neoplásicas de una realización de este tipo incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer de hígado.

45 El inhibidor de Hec1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, en el que la enfermedad neoplásica contiene célula(s) neoplásica(s), puede comprender además el uso de un segundo agente quimioterápico/citotóxico. Tal método puede utilizar una dosificación o dosificaciones que es/son eficaces para lograr un resultado sinérgico sobre la inhibición del crecimiento de una célula neoplásica de este tipo. El inhibidor de Hec1 se selecciona del grupo que consiste en, N-(4-(4-isopropoxi-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (100951); N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101001); 2-fluoro-N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101015); N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iloxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (Hec1 10091); N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110095); y N-(4-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110096). Tales inhibidores de Hec1 pueden estar en forma de bases libres o en forma de sales. Una realización de este tipo puede utilizar fármacos citotóxicos y/o quimioterápicos tales como taxol, doxorubicina y topotecán, sin embargo, se contempla el uso de cualquier fármaco o fármacos citotóxicos y/o quimioterápicos adecuados.

60 El inhibidor de Hec1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, en el que la enfermedad neoplásica contiene célula(s) neoplásica(s) que pueden ser resistentes a múltiples fármacos (o resistentes al tratamiento con imatinib) al poner en contacto la célula neoplásica con un inhibidor de Hec1 a una dosis eficaz para lograr la inhibición del crecimiento. En algunas realizaciones del concepto inventivo, el inhibidor de Hec1 puede

5 usarse en combinación con un segundo agente quimioterápico o citotóxico. Los inhibidores de Hec1 se seleccionan del grupo que consiste en, N-(4-(4-isopropoxi-2,6-dimetilfenil) tiazol-2-il) isonicotinamida (100951); N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101001); 2-fluoro-N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil) tiazol-2-il)isonicotinamida (101015); N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iloxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (Hec1 10091); N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110095); y N-(4-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110096). Dichos inhibidores de Hec1 pueden estar en forma de bases libres o en forma de sales. Una realización de este tipo puede utilizar fármacos citotóxicos y/o quimioterápicos tales como taxol, doxorubicina y topotecán, sin embargo, se contempla el uso de cualquier fármaco o fármacos citotóxicos y / o quimioterápicos adecuados.

10 Diversos objetos, características, aspectos y ventajas del objeto de la invención se volverán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas, junto con las figuras de los dibujos adjuntos en las que números similares representan componentes similares.

15 En particular, la invención se refiere a un método de determinación de la sensibilidad de una célula neoplásica a un inhibidor de Hec1 en la evaluación de una enfermedad neoplásica, que comprende: usar una muestra de un paciente que comprende una célula neoplásica o células neoplásicas; formar un complejo detectable de cada uno de Hec1, Rb y p53, en el que cada uno de Hec1, Rb y p53 se deriva de la muestra; usar el complejo detectable de Hec1 para determinar el nivel de expresión de Hec1, usar el complejo detectable de Rb para determinar el estado de Rb, y usar el complejo detectable de p53 para determinar el estado de p53, para obtener un resultado de prueba; y comparar el resultado de prueba con un resultado de referencia de una célula no neoplásica que incluye el nivel de expresión de Hec1, estado de Rb, y estado de p53 de la célula no neoplásica para predecir de ese modo la sensibilidad de la célula neoplásica al inhibidor de Hec1, en el que un nivel de expresión aumentado de Hec1 en relación con el correspondiente resultado de referencia y una forma mutada o delecionada de cada uno de Rb y p53 en relación con el correspondiente resultado de referencia son indicativos de sensibilidad de la célula neoplásica al inhibidor de Hec1; y en el que el inhibidor de Hec1 se selecciona del grupo que consiste en

25 N-(4-(4-isopropoxi-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (100951),
N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101001),
2-fluoro-N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101015),
N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iloxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (Hec1 10091),
N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110095), y
30 N-(4-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110096), y sus formas de sal.

Además, la invención se refiere a un inhibidor de Hec1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, en el que la enfermedad neoplásica contiene célula(s) neoplásica(s) que se determina que es/son sensible(s) al inhibidor de Hec1 mediante el método tal como se especificó anteriormente, y en el que el inhibidor de Hec1 se selecciona del grupo que consiste en

35 N-(4-(4-isopropoxi- 2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (100951),
N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101001),
2-fluoro-N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101015),
N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iloxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (Hec1 10091),
40 N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110095), y
N-(4-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)iso nicotinamida (110096), y sus formas de sal.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra la relación entre los GI50 de compuestos inhibidores de Hec1 y expresión de Hec1: la figura 1A muestra los niveles de expresión de la proteína Hec1 en la proteína total a partir de líneas celulares mantenidas de manera asincrónica. Los niveles de expresión de la proteína Hec1 se cuantificaron y se expresaron en % en relación con niveles de expresión de HeLa y se categorizaron como muy sensibles ($GI_{50} < 50$ nM), moderadamente sensibles ($50 \text{ nm} < GI_{50} < 100 \text{ nm}$), parcialmente sensibles ($100 \text{ nm} < GI_{50} < 1 \text{ } \mu\text{M}$), o resistentes (con $GI_{50} > 10 \text{ } \mu\text{M}$ a un inhibidor de Hec1. La figura 1B muestra niveles de expresión de ARN de Hec1 en ARN total. Se cuantificó la expresión de ARN de Hec1, se expresó en % en relación con niveles de expresión de HeLa, y se representó gráficamente frente a la expresión de proteínas para determinar la correlación. La figura 1C muestra datos recopilados para la expresión de proteínas Hec1 en líneas celulares de cáncer categorizadas como sensibles ($GI_{50} < 300 \text{ } \mu\text{M}$) o resistentes

(GI50 > 300 μ M) en respuesta a un inhibidor diferente de Hec1. La figura 1D muestra el log10 de datos de GI50 recogidos de ensayos de selección de líneas celulares utilizando cuatro análogos de compuestos Hec1 (100951, 101001, 101015 y 110095) representados frente a los niveles de expresión de la proteína Hec1. Se utilizó una prueba de la T de 2 colas para determinar la significación (el valor de P para todos los fármacos sometidos a prueba fue de $4,3 \times 10^{-17}$). La figura 1E muestra la correlación entre el nivel de expresión de ARN de Hec1 en cuanto a % de ARN total y nivel de expresión de la proteína Hec1 en cuanto a % de proteína total.

La figura 2 muestra la expresión de Hec1 en diferentes líneas celulares de cáncer y en subtipos de cáncer de pulmón y cáncer de mama de muestras de pacientes humanos. La figura 2A y la figura 2B muestran datos de expresión de Hec1(NDC80) obtenidos de la base de datos GEO GSE8894 y GSE14814, respectivamente, para tumor de cáncer de pulmón humano expresados como el logaritmo de la intensidad de expresión; los resultados muestran una elevada expresión de Hec1 en carcinoma de células escamosas. La figura 2C muestra datos de expresión de Hec1(NDC80) obtenidos de la base de datos GEO GSE 20685 para muestras de tumor de cáncer de mama expresadas como el logaritmo de la intensidad de expresión; los resultados muestran una elevada expresión de Hec1 en tipo I.

La figura 3 muestra el efecto del silenciamiento de ARNip de Rb sobre la sensibilidad de la célula cancerosa a compuestos inhibidores de Hec1. La figura 3A muestra el efecto de silenciamiento mediante transfección de células Rb MDA-MB-231 silvestres transfectadas con o bien ARNip de control o bien ARNip dirigido a Rb (siRb) sobre la sensibilidad (en cuanto a GI50) con respecto al compuesto inhibidor de Hec1 101001. También se muestra la expresión de ARN de Rb en células transfectadas. La figura 3B muestra la sensibilidad celular de líneas celulares seleccionadas con Rb silvestre (231, MDA-MB-231, K562, ZR-75-1, T47D, A549, HCT116) o Rb mutado (HeLa) transfectado con uno de dos ARNip dirigidos a Rb y tratados como en la figura 3A, expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento en relación con células no tratadas con fármaco. Las inmunotransferencias de lisados de células transfectadas sondadas para Rb se muestran debajo de los correspondientes gráficos de inhibición.

La figura 4 muestra el efecto del silenciamiento de ARNip de p53 sobre la sensibilidad de la célula cancerosa a compuestos inhibidores de Hec1. La figura 4A muestra el efecto de silenciamiento mediante transfección de células p53 silvestres (A549, HCT116) transfectadas o bien con ARNip de control o ARNip dirigido a p53 (sip53) sobre la sensibilidad (en cuanto a GI50) con respecto al compuesto inhibidor de Hec1 101001. La sensibilidad celular se expresa en GI50 (nM). También se muestra la expresión de ARN de p53 de células transfectadas. La figura 4B muestra la sensibilidad celular de líneas celulares seleccionadas con p53 silvestre (A549, HCT116, ZR-75-1, U2OS) o p53 mutado (HeLa) transfectado con uno de dos diferentes ARNip dirigidos a p53 y tratados como en la figura 4A, expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento en relación con células no tratadas con fármaco. Las inmunotransferencias de lisados de células transfectadas sondadas para p53 se muestran debajo de los correspondientes gráficos de inhibición.

La figura 5 muestra diferencias en la inducción de fosforilación de p73, activación de marcadores apoptóticos y regulación por disminución de marcadores anti-apoptóticos mediante inhibidor de Hec1 entre células que responden al fármaco (GI50 < 10 μ M) y células que no responden al fármaco (GI50 > 10 μ M). También se muestra actina como control. La figura 5A muestra una inmunotransferencia que demuestra el efecto de compuestos inhibidores de Hec1 (200 nM) sobre la expresión de p73 fosforilada (P-p73) en células HeLa que responden al fármaco y células A549 que no responden al fármaco tratadas con compuestos inhibidores de Hec1 seleccionados a 200 nM a diversos puntos de tiempo. La figura 5B muestra una inmunotransferencia que demuestra el efecto de compuestos inhibidores de Hec1 (1 μ M) sobre la expresión de marcadores apoptóticos caspasa3, PARP y marcadores anti-apoptóticos Mcl-1, XIAP, Bcl-2 en células HeLa que responden al fármaco. La figura 5C muestra una inmunotransferencia que demuestra el efecto de compuestos inhibidores de Hec1 y Taxol seleccionados sobre la expresión de marcadores apoptóticos caspasa3, PARP y marcadores anti-apoptóticos Mcl-1, XIAP, Bcl-2 en células A549 que no responden al fármaco. La figura 5D muestra una inmunotransferencia que demuestra el efecto del compuesto inhibidor de Hec1 101001 sobre la expresión de marcadores apoptóticos caspasa3, PARP y marcadores anti-apoptóticos Mcl-1, XIAP, Bcl-2 en células HeLa que responden al fármaco y células A549 que no responden al fármaco.

La figura 6 muestra regulación del ciclo celular diferencial de expresión de proteínas Hec1 y Nek2 y regulación por disminución diferencial de proteína Nek2 mediante inhibidor de Hec1 en células que responden al fármaco (GI50 < 10 μ M) y células que no responden al fármaco (GI50 > 10 μ M). La figura 6A muestra inmunotransferencias de Hec1 y Nek2 de células sincronizadas que responden al fármaco (HeLa, MDA-MB- 468, HCT116) y células que no responden al fármaco (A549) a diversos puntos de tiempo. Se incluye actina como control de carga. La figura 6B muestra inmunotransferencias de Nek2 de células que responden al fármaco (HeLa, HCT116) y células que no responden al fármaco (A549) tratadas con un control de DMSO y con un compuesto inhibidor de Hec1 a diferentes concentraciones. La figura 6C muestra inmunotransferencias de ciclina B1 y ciclina D1 para células HeLa tratadas con o bien un control de DMSO o bien un compuesto inhibidor de Hec1 durante diferentes periodos de tiempo. Se incluye actina como control de carga.

Las realizaciones expuestas en los dibujos son de naturaleza ilustrativa y no se pretende que limiten la invención definida por las reivindicaciones. Además, características individuales de los dibujos y la invención serán más evidentes en vista de la descripción detallada.

Descripción detallada

Basándose en el descubrimiento reciente de una molécula pequeña que era capaz de dirigirse selectiva y/o específicamente a la ruta de Hec1/Nek2, los inventores han desarrollado diversos inhibidores de Hec1 mejorados que se dirigen al componente del cinetocoro Hec1, que se sobreexpresa en diversos cánceres humanos. Estos compuestos condujeron a los inventores a investigar los papeles de Hec1, Rb y p53 en la sensibilidad del fármaco inhibidor de Hec1 en células cancerosas.

Las células dependen del control del ciclo celular bien regulado durante la mitosis para funcionar correctamente. Los procesos mitóticos desregulados observados en las células cancerosas involucran procesos tales como la formación anómala del huso y la segregación de cromosomas. Hec1 se expresa lo más abundantemente en células que se dividen rápidamente, pero no en células diferenciadas terminalmente. Se ha demostrado que Hec1 está regulada por incremento en las células tumorales del cerebro, hígado, mama y pulmón en los perfiles de expresión de todo el genoma, sobreexpresada en líneas celulares de cáncer de cuello uterino, colorrectal, de mama y de pulmón, y tejidos de cáncer colorrectal y gástrico. Por tanto, la expresión diferencial de Hec1 en células rápidamente diferenciadas, líneas celulares transformadas y tejidos cancerosos sugiere que Hec1 puede ser un candidato excelente en la terapia dirigida de cánceres humanos. Del mismo modo, el potencial de Hec1 como diana para la terapia contra el cáncer puede apoyarse en un análisis estadístico que correlacione la expresión de Hec1 y la C150.

Hec1 se asocia con el gen del retinoblastoma (Rb), que desempeña un papel importante en la fase G2-M del ciclo celular. Más específicamente, en la fase G2-M, Rb interactúa con la proteína fosfatasa 1 alfa, una proteína que se ha demostrado que es esencial para la función del cinetocoro. La fosforilación de Rb en las fases G1-S del ciclo celular se coordina con la inducción y degradación de las ciclinas en la fase G2-M. Rb también regula directamente la segregación de cromosomas e interactúa con Hec1 en la fase G2-M. Las células que carecen de Rb funcional no pueden terminar la mitosis correctamente y la mitosis de dichas células produce hiperploidía. Estas relaciones sugieren que Rb puede tener un papel en las etapas mitóticas que involucran a Hec1.

P53 es una proteína multifuncional que incluye diversos dominios estructurales que están involucrados en interacciones específicas y complejas con ADN, ARN, proteínas y metabolitos celulares. El gen p53 a menudo está mutado en el cáncer, principalmente con mutaciones sin sentido que dan como resultado reemplazos de residuos de aminoácidos individuales). Dichas proteínas p53 mutadas se agrupan en diferentes grupos estructurales. Por ejemplo, las proteínas p53 con mutaciones de "punto caliente" que se producen dentro del dominio de unión a ADN pueden caracterizarse como mutantes de contacto de ADN o mutantes conformacionales. La p53 mutante a menudo se expresa altamente a lo largo de la progresión del tumor (incluyendo metástasis avanzadas y distantes), lo que implica que puede poseer propiedades de ganancia de función (GOF). Tales propiedades GOF permiten que la p53 mutante interactúe con los sitios de la cromatina que difieren de los sitios de la cromatina que interactúan con p53 silvestre, y con una variedad de factores transcripcionales que pueden regular por incremento o suprimir genes tales como el gen 1 de resistencia a múltiples fármacos o la caspasa-3, respectivamente. También se ha demostrado que la inactivación de p53 silvestre potencia la sensibilidad a múltiples agentes quimioterápicos, incluyendo cisplatino, carboplatino y taxol.

Basándose en las consideraciones anteriores y otros factores, los inventores han descubierto ahora que la sensibilidad de células a inhibidores de Hec1 puede predecirse de manera exacta y fiable mediante el estado y/o nivel de expresión de Hec1 (HEC), Rb(RB1) y/o p53 (TP53). Esto permite ventajosamente la identificación temprana de pacientes con cáncer que pueden beneficiarse de la terapia con inhibidor de Hec1, que a su vez puede conducir a tratamiento más eficaz de la enfermedad mientras se encuentra aún en una etapa temprana.

Más específicamente, los inventores han descubierto que el nivel de expresión de Hec1 se correlaciona positivamente con la sensibilidad de células neoplásicas al tratamiento con inhibidores de Hec1, y que la delección, desregulación o disfunción de Rb y/o p53 también se correlacionan positivamente con la sensibilidad de células neoplásicas al tratamiento con inhibidores de Hec1. Por tanto, debe apreciarse que tal correlación no sólo puede permitir la predicción del éxito del tratamiento de células neoplásicas y tejido con inhibidores de Hec1, sino que también determinados tipos de cáncer serán, *a priori*, susceptibles o, alternativamente, resistentes al tratamiento con inhibidores de Hec1.

Por ejemplo, tal como también se muestra con más detalle a continuación, determinadas líneas celulares neoplásicas y células neoplásicas con expresión relativamente alta de Hec1 (por ejemplo, Hep3B/carcinoma hepatocelular, HeLa/cáncer de cuello uterino, T47D/carcinoma metastásico, pleural, invasivo, ductal) pueden ser altamente susceptibles al tratamiento con inhibidores de Hec1, mientras que otras líneas celulares con expresión de Hec1 sustancialmente baja o nula (por ejemplo, MOLT-4/leucemia linfoblástica aguda, N87/cáncer gástrico) pueden ser significativamente menos sensibles (o resistentes) al tratamiento con inhibidores de Hec1.

Tal sensibilidad diferencial también puede ser útil en la tipificación y/o tratamiento de tipos o categorías individuales de cáncer. Por ejemplo, se categorizan los subtipos moleculares de cáncer de mama en los tipos I-VI, sin embargo sólo los tipos I y IV presentan niveles significativos de expresión de Hec1 y, por tanto, es probable que sean sensibles al tratamiento con inhibidor de Hec1. De manera similar, la identificación de un tipo o categoría específica de un cáncer en un paciente puede indicar una posible sensibilidad a inhibidores de Hec1, y por tanto puede

utilizarse para optimizar el tratamiento.

Se da a conocer en el presente documento un método de selección de sujetos que padecen una enfermedad proliferativa para el tratamiento con un inhibidor de Hec1 (opcionalmente en combinación con un agente citotóxico), en el que tal selección se basa en determinación previa de la expresión y/o estado de Hec1. Se da a conocer además en el presente documento que, la expresión y/o estado de Hec1 pueden determinarse mediante cuantificación del nivel de expresión del gen Hec1 silvestre (HEC), presencia de un gen Hec1 mutado (HEC), o mediante determinación de la ausencia, deficiencia (en relación con un control sano) o delección del gen Hec1 (HEC). De manera similar, también debe apreciarse que tal cuantificación también puede incluir una determinación del nivel de expresión y/o modificación/modificaciones postraduccionales(es) de Hec1 en una muestra obtenida del sujeto. Por ejemplo, tal determinación puede realizarse determinando el nivel de expresión de Hec1 silvestre en el sujeto y compararlo con el nivel de expresión de gen Hec1 (HEC) silvestre en un sujeto de control sano. Además, o alternativamente, un sujeto de control también puede representar un tumor que responde o no responde que responde a una terapia específica, lo más normalmente tratamiento con un inhibidor de Hec1. En tal caso, cuando el control representa un tumor que responde a la terapia, una mayor expresión de gen Hec1 (HEC) silvestre en el individuo en comparación con el control puede predecir una capacidad de respuesta probable a la terapia. Por el contrario, cuando un control representa un tumor resistente a la terapia, un menor nivel de expresión de Hec1 en el individuo en comparación con el control puede predecir una resistencia probable a la terapia.

Se da a conocer en el presente documento un método en el que se seleccionan pacientes para el tratamiento con un inhibidor de Hec1 donde el paciente padece una enfermedad proliferativa adecuada para el tratamiento con un inhibidor de Hec1, y en el que tal selección de pacientes se basa (al menos en parte) en una etapa de caracterización o determinación del estado de Rb. El estado de Rb puede caracterizarse determinando la presencia del gen Rb (RB1) silvestre, la presencia de un gen Rb (RB1) mutado, la ausencia, deficiencia o delección del gen Rb (RB1), y/o el nivel de expresión y/o modificación/modificaciones postraduccionales(es) de Rb en una muestra derivada del sujeto. Tal como se indicó anteriormente, debe apreciarse que la expresión reducida o carente de Rb, o tener un Rb (RB1) desregulado y/o disfuncional, puede ser indicativo de la capacidad de respuesta de una célula neoplásica al tratamiento con un inhibidor de Hec1. Por tanto, puede seleccionarse una población de pacientes para el tratamiento con un inhibidor de Hec1 basándose en sujetos que muestran estado de Rb (RB1) insuficiente/mutado/delecionado.

Se da a conocer además en el presente documento un método de selección de sujetos que padecen una enfermedad proliferativa para el tratamiento con un inhibidor de Hec1 (opcionalmente en combinación con un agente citotóxico), en el que tal método incluye una etapa de determinación de la sensibilidad de la enfermedad proliferativa en dichos sujetos al tratamiento usando un inhibidor de Hec1 mediante caracterización o determinación del estado de p53. Por ejemplo, tales métodos pueden comprender una etapa de determinación del estado de p53 por medio de la identificación y/o cuantificación del gen p53 (TP53) silvestre, un gen p53 (TP53) mutado, o la ausencia, deficiencia o delección del gen p53 (TP53) y/o el nivel de expresión y/o modificación/modificaciones postraduccionales(es) de p53 en una muestra derivada del sujeto. Por tanto, puede seleccionarse una población de pacientes para el tratamiento con un inhibidor de Hec1 basándose en sujetos que muestran estado de p53 (TP53) insuficiente/mutado/delecionado.

Debe apreciarse que, más allá de su utilidad como indicadores individuales, el estado y la expresión de los genes Hec1, Rb y p53 pueden usarse en combinación como base para la selección de una población de pacientes para el tratamiento con un inhibidor de Hec1. Por ejemplo, el genotipo de Hec1, la expresión de Hec1, el genotipo de Rb, la expresión de Rb, el genotipo de p53 y/o la expresión de p53 pueden utilizarse individualmente o en cualquier combinación como indicador de sensibilidad de la enfermedad neoplásica o líneas celulares a un compuesto inhibidor de Hec1.

Debe apreciarse que la detección, cuantificación y/o caracterización de genes y productos génicos, tales como (por ejemplo) genes y productos génicos relacionados con Hec1, Rb y p53, pueden incluir el marcaje o etiquetado de un gen o producto génico y/o la formación de un complejo detectable. Dicho marcaje puede ser directo o indirecto. Por ejemplo, un gen o producto génico (tal como ARN o proteína) puede marcarse directamente modificando su composición para que sea detectable, por ejemplo, colocando un resto detectable en el gen y/o producto génico que va a caracterizarse para formar un complejo detectable. De manera similar, un gen o producto génico puede marcarse indirectamente interactuando con un compañero de unión (tal como, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos complementaria, secuencia de análogos de ácidos nucleicos complementaria, aptámero o anticuerpo) que porta un resto detectable para formar un complejo detectable. Alternativamente, un gen o producto génico (por ejemplo, de una muestra de paciente) puede marcarse por su capacidad para desplazar un análogo de gen que porta un resto detectable o un análogo de producto génico que porta un resto detectable de un compañero de unión (tal como por ejemplo, una secuencia complementaria de ácidos nucleicos, secuencia de análogos de ácidos nucleicos complementaria, aptámero o anticuerpo) y, por tanto, modular la formación de un complejo detectable. Los restos detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, moléculas fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas luminiscentes, enzimas, metales, biotina y/o análogos de biotina, puntos cuánticos, micropartículas, radionúclidos, ácidos nucleicos y/o análogos de ácidos nucleicos, etiquetas de masa isotópica, etiquetas de giro, cargas positivas o negativas, o una combinación de estos.

- En este contexto, debe indicarse que todas las maneras conocidas de determinación de genotipo y/o cuantificación de Hec1, Rb y/o p53, los productos de ácido nucleico y proteína se consideran adecuados para su uso en el presente documento. Los métodos particularmente adecuados incluyen (pero no se limitan a) secuenciación de ADN, determinación del número de copias, determinación de haplotipo, secuenciación de ARN, qPCR, RT-PCR, q-RT-PCR, PCR digital, hibridación de tipo Southern y/o Northern, FISH, análisis de microalineamiento, hibridación/cuantificación en fase líquida, cuantificación amperométrica y/o fluorométrica, determinación inmunométrica, y/o cualquier método adecuado para caracterizar un gen y/o un producto génico. Alternativa, o adicionalmente, cuando el análisis citopatológico o histopatológico es indicativo de un estado particular para Hec1, Rb y/o p53, pueden omitirse por completo análisis cuantitativos diferenciados.
- 5
- 10 Con respecto al tratamiento con un inhibidor de Hec1, debe apreciarse que los inhibidores de Hec1 incluyen los descritos en el documento WO 2011/115998 y la solicitud provisional estadounidense en tramitación junto con la presente con el número de serie 64/564.773. Por tanto, los inhibidores de Hec1 incluyen
- N-(4-(4-isopropoxi-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (100951),
- N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101001),
- 15 2-fluoro-N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101015),
- N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iloxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110091),
- N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110095), y
- N-(4-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110096).
- 20 Todavía se contempla además que el inhibidor de Hec1 pueda coadministrarse con uno o más agentes citotóxicos, por ejemplo con un metabolito antineoplásico, un inhibidor de topoisomerasa I o II, y/o un agente activo de microtúbulos. Todos estos agentes conocidos se consideran adecuados para su uso en el presente documento. Con respecto a la dosificación de tales agentes, tales agentes pueden administrarse a las dosificaciones conocidas actualmente, o algo por debajo de tales dosificaciones conocidas.
- 25 Sorprendentemente, cuando se coadministran los inhibidores de Hec1 contemplados con uno o más agentes citotóxicos, se observa actividad sinérgica con compuestos seleccionados, tal como se describe en más detalle adicionalmente a continuación. Lo más ventajosamente, pueden observarse respuestas sinérgicas para una combinación de inhibidor de Hec1 y taxol, doxorubicina y topotecán. Sin limitarse al objeto de la invención, se contempla que pueda observarse una acción sinérgica en células y/o tejidos en los que las células y/o tejido son sensibles a inhibidores de Hec1 a concentraciones iguales a o menores de 100 nM (tabla 9 a tabla 11).
- 30 De manera igualmente destacable, los compuestos inhibidores de Hec1 contemplados también presentan actividad significativa contra diversas líneas celulares que se considera que son resistentes a fármacos, proporcionando por tanto un lugar adicional para el tratamiento de células y tejidos que serían de otro modo insensibles (tabla 8). Además, los inventores también observaron que los inhibidores de Hec1 contemplados en el presente documento presentaron actividad y desencadenan una(s) respuesta(s) apoptótica(s) en células que responden (GI₅₀ <1 μM), y
- 35 no desencadenan inducción de una(s) respuesta(s) apoptótica(s) en células que no responden (GI₅₀ >1 μM) (figura 5).

Ejemplos

Materiales y métodos

- 40 **Cultivo celular:** las líneas celulares de cáncer A549, MDA-MB231, K562, HCT116 las proporcionó el Dr. Y.S.Lee (Development Center for Biotechnology, Nuevo Taipei, Taiwán). Se obtuvieron las líneas celulares T47D, ZR-75-1 de BCRC (Bioresource Collection and Research Center, Taiwán). Se mantuvieron las líneas celulares inicialmente en medio sugerido y se adaptaron para mantenerse en medio que contiene suero bovino fetal al 10%, medio de Eagle modificado con Dulbecco (DME) de bajo contenido en glucosa (1 g/l) a 37°C en aire que contiene CO₂ al 5%.
- 45 **Sensibilidad al fármaco:** se seleccionaron líneas celulares para determinar la sensibilidad al fármaco mediante tratamiento con fármacos específicos 24 horas después de la siembra en números de siembra apropiados en placas de 96 pocillos que contienen DME de bajo contenido en glucosa con FBS al 10%. Se añadió el fármaco a la placa en pocillos por triplicado, y se incuban las células en medio tratado con fármaco durante 96 horas antes de que se determinara la viabilidad celular mediante ensayo MTS usando el sistema de ensayo de proliferación celular no radiactivo acuoso CellTiter 96® (Promega, Madison, WI 53711 EE.UU.). Se realizó el ensayo MTS según las
- 50 instrucciones del fabricante. Se midió la densidad óptica usando un espectrofotómetro Bio-Tek 340 (Bio-Tek, Winooski, VT 05404) y entonces se procesaron las lecturas ópticas en Excel (Microsoft, Redmond, WA 98052-7329) y software de regresión lineal GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA 92037 EE.UU.) para determinar las curvas de concentración-respuesta para calcular GI₅₀ relativas. El valor de GI₅₀ se refiere a una concentración que provoca el 50% de inhibición del crecimiento. El % de inhibición del crecimiento del fármaco de prueba en

células se calculó como: $[1 - (\text{valor de prueba})/(\text{valor de control})] \times 100$; se usaron estos valores para representar las curvas de concentración-respuesta, y luego se analizaron con software de regresión lineal.

Sinergia: se determinaron GI50 para fármacos seleccionados y se usaron para calcular una razón de concentración para su uso en ensayos de sinergia con inhibidores de Hec1. Se sometieron las células a prueba con fármacos 24 horas después de sembrarse en números de siembra apropiados en placas de 96 pocillos que contenían DME de bajo contenido en glucosa con FBS al 10%. Se añadieron inhibidor de Hec1 y fármacos seleccionados a la placa en pocillos por triplicado en las razones de concentración de GI50 determinadas, y se incubaron las células en medio tratado con fármaco durante 96 horas antes de la determinación de la viabilidad celular. Se determinó la viabilidad celular mediante ensayo MTS usando un sistema de ensayo de proliferación celular no radiactivo acuoso CellTiter 96® (Promega, Madison, WI 53711 EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se determinó la densidad óptica usando un espectrofotómetro Bio-Tek 340 (Bio-Tek, Winooski, VT 05404) y luego se procesaron usando Excel (Microsoft, Redmond, WA 98052-7329) y software de regresión lineal GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA 92037 EE.UU.) para determinar curvas de concentración-respuesta para calcular GI50 relativas. Se determinó la sinergia calculando un valor de índice de combinación usando la fórmula CI (índice de combinación) = $(CA_X/IC_{X,A}) + (CB_X/IC_{X,B})$, donde CA_X y CB_X son las concentraciones de fármaco A y fármaco B usadas en combinación para lograr el x% de efecto del fármaco. $IC_{X,A}$ e $IC_{X,B}$ son las concentraciones para agentes individuales para lograr el mismo efecto.

Silenciamiento génico: se sembraron las células en los pocillos de placas de 96 pocillos en números celulares apropiados y se transfectaron mediante el método de transfección siPort NeoFx (Life Technologies, Carlsbad, California 92008 EE.UU.) según instrucciones del fabricante, se mantuvieron durante 24 horas, luego se trataron con fármaco. Se incubaron las células en medio tratado con fármaco durante 48 horas, luego se analizaron mediante ensayo MTS. Se usaron ARNip de control Life Technologies, Carlsbad, California 92008; Cell Signaling Technology, Danvers, MA 01923 EE.UU.; y Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. 95060 EE.UU.), ARNip de Rb (n.º 1: Life Technologies, Carlsbad, California 92008 EE.UU.; n.º 2: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. 95060 EE.UU.) y ARNip de p53 (n.º 1: Cell Signaling Technology, Danvers, MA 01923 EE.UU.; n.º 2: Cell Signaling Technology, Danvers, MA 01923 EE.UU.). Se sometieron las células a prueba con fármacos 24 horas después de la siembra y se incubaron con los fármacos durante 48 horas antes del ensayo MTS. Se realizó el ensayo MTS según las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI 53711 EE.UU.).

Inmunotransferencias: se realizaron lisado celulares mediante incubación de células en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NP40 al 1%, DOC al 0,25%, SDS al 0,1%, NaVO4 1 mM, EDTA 1 mM, leupeptina 1 ug/ml, pepstatina 1 µg/ml) o tampón de muestra 2,5X (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS al 1%, BME al 2,5%, glicerol al 7,5%, azul de bromofenol). Se sumergieron muestras de tejido en tampón RIPA, alteradas con un homogeneizador y se centrifugaron para clarificar. Las muestras se sometieron entonces a SDS-PAGE, se transfirieron sobre membranas de inmunotransferencia, y se incubaron con anticuerpos primarios en BSA-TBST al 3%. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa del rábano rusticano para detección de proteínas mediante quimioluminiscencia potenciada (Millipore, Billerica, MA 01821 EE.UU.). Se usaron los siguientes anticuerpos para inmunotransferencia de tipo Western: anticuerpo monoclonal anti-Rb 1F8 (Abcam, Cambridge, MA 02139-1517 EE.UU.); anticuerpo monoclonal anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. 95060 EE.UU.); anticuerpo monoclonal anti-β-actina AC-15 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

PCR cuantitativa en tiempo real: se aisló ARN total usando un kit Quick-RNA miniPrep (Zymo Research, Irvine, CA 92614 EE.UU.). Se realizó transcripción inversa y PCR en tiempo real cuantitativa en un ABI Prism 7500 (Life Technologies, Carlsbad, California 92008 EE.UU.) usando un kit SYBR ExTaq qRT-PCR de una etapa (Takara-Bio, Shiga, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de cebador usadas para GAPDH fueron:

5'-GGTTTACATGTTCCAATATGATTCCA-3' (directo),

5'-ATGGGATTTCCATTGATGACAAG-3' (inverso). Las secuencias de cebadores usadas para Rb fueron:

5'-GCAGTATGCTTCCACCAGGC-3' (directo),

5'-AAGGGCTTCGAGGAATGTGAG-3' (inverso). Las secuencias de cebadores usadas para p53 fueron:

5'-GCCCCAGGGAGCACTA-3' (directo), 5'-GGGAGAGGAGCTGGTGTG-3' (inverso).

Expresión génica en muestras clínicas: se obtuvieron datos de expresión del gen HEC de la base de datos GSE, se analizaron y se expresaron como el logaritmo de la intensidad de expresión génica en base 2.

La siguiente discusión proporciona numerosas realizaciones a modo de ejemplo del objeto de la invención. Aunque cada realización representa una combinación individual de elementos de la invención, el objeto de la invención se considera que incluye todas las posibles combinaciones de los elementos dados a conocer. Por tanto, si una realización comprende elementos A, B y C, y una segunda realización comprende elementos B y D, entonces el objeto de la invención también se considera que incluye otras combinaciones restantes de A, B, C o D, incluso si no se da a conocer explícitamente. Además, a menos que el contexto dicte lo contrario, todos los intervalos expuestos en el presente documento deben interpretarse como inclusivos de sus puntos finales e intervalos de extremos

abiertos debe interpretarse que incluyen sólo valores comercialmente prácticos. De manera similar, todas las listas de valores deben considerarse que incluyen valores intermedios a menos que el contexto indique lo contrario.

5 Correlación entre la expresión de Hec1 y sensibilidad celular a inhibidores de Hec1: los resultados de caracterizar una variedad de líneas celulares de cáncer para determinar su sensibilidad a inhibidores de Hec1 se muestran en la tabla 1. Tal como será evidente, tales células varían en sus sensibilidades al inhibidor de Hec1. En este caso, las líneas celulares indicadas se trataron con inhibidor de Hec1 (101001) y se analizaron para determinar su actividad proliferativa y metabólica. La tabla 1 enumera las líneas celulares seleccionadas en orden de GI50 creciente, y las agrupa según su sensibilidad al inhibidor de Hec1.

Líneas celulares	Tipo de cáncer	pRb	p53	TAI-101001 GI50 (nM)	
Sensibilidad fuerte ($G_{60} < 50$ nM)	K562	leucemia mieloide crónica	silvestre	mut	13,48
	HeLa	cáncer de cuello uterino	mut	inactivado	15,83
	T47D	carcinoma ductal invasivo, metastásico-pleural, de mama	silvestre	mut	17,09
	U-937	leucemia mieloide aguda	silvestre	nulo	22,03
	MDA-MB-453	adenocarcinoma, metastásico-efusión, de mama	silvestre	mut	23,57
	RPM18226	leucemia mieloide aguda	mut	mut	27,19
	KG-1	leucemia mielógena	reordenado	reducido/no	28,90
	MDA-MB-468	carcinoma ductal invasivo, metastásico-pleural, de mama	mut/no	mut	33,64
	HCT116	carcinoma colorrectal	bajo	silvestre	38,94
	COLO205	carcinoma colorrectal	silvestre	no	40,23
	MDA-MB-231	carcinoma ductal invasivo, metastásico-pleural, de mama	silvestre	mut	43,31
Sensibilidad moderada (50 nM $< G_{60} < 100$ nM)	PC3	cáncer de próstata	silvestre	nulo	60,00
	MCF7	carcinoma ductal invasivo, metastásico-pleural, de mama	silvestre	silvestre heterogéneo	63,70
	NCI-H520	cáncer de pulmón no microcítico	silvestre	ARNm reducido	67,86
	ZR-75-30	carcinoma ductal invasivo, metastásico-ascitis, de mama	silvestre	silvestre	76,78
	ZR-75-1	carcinoma ductal invasivo, metastásico-ascitis, de mama	silvestre	silvestre	79,62
	Huh7	carcinoma hepatocelular	silvestre	mut	84,32
	BT474	carcinoma ductal invasivo, primario, de mama	silvestre	mut	85,70
	PLC/PRF/5	carcinoma hepatocelular	silvestre	inactivado	91,61
	Hep3B	carcinoma hepatocelular	no	delección	96,06
	U2OS	osteosarcoma	menos activo	silvestre	139,30
Sensibilidad baja (100 nM $< G_{60} < 1$ uM)	Hs578T	carcinoma ductal invasivo, metastásico, de mama	silvestre	mut	143,03
	MV4-11	leucemia mieloide aguda	silvestre	mut	231,00
	RS4;11	leucemia mieloide aguda	silvestre	mut	254,00
	HepG2	carcinoma hepatocelular	silvestre	silvestre	272,67
	MOLM-13	leucemia mieloide aguda	silvestre	mut	315,00
	Resistente ($G_{60} > 1$ uM)	A549	cáncer de pulmón no microcítico	silvestre	silvestre
HCC1954		carcinoma ductal invasivo, de mama	mut	silvestre	> 10 uM
MDA-MB-361		adenocarcinoma, metastásico-cerebro, de mama	silvestre	no	> 10 uM
MOLT-4		leucemia linfoblástica aguda	silvestre	silvestre	> 30 uM
N87		cáncer gástrico	silvestre	silvestre	> 30 uM

Tabla 1

5 Para caracterizar posibles mecanismos para la resistencia a fármacos en líneas celulares resistentes al inhibidor de Hec1, se determinaron los niveles de expresión de proteínas Hec1 y ARN en líneas celulares resistentes y sensibles al inhibidor de Hec1 101001. Se realizaron estudios similares para caracterizar los niveles de expresión de proteínas Hec1 en líneas celulares identificadas como sensibles ($G_{150} < 300$ nM) y resistentes ($G_{150} > 300$ nM) a un segundo

inhibidor de Hec1, 110095. Se lisaron líneas celulares mantenidas de manera asincrónica y se inmunotransfirió su proteína total para determinar niveles de expresión de Hec1. Los niveles de expresión de la proteína Hec1 se cuantificaron y se expresaron en % en relación con niveles de expresión de HeLa (figura 1A). De manera similar, se recogieron líneas celulares mantenidas de manera asincrónica y se analizó su ARN total para determinar niveles de expresión de Hec1 en relación con HeLa mediante PCR en tiempo real cuantitativa (figura 1B). Se observó que las líneas celulares resistentes al inhibidor de Hec1 101001 (GI50 >10uM) A549 y MDA-MB-361 tenían bajos niveles de expresión de Hec1 mientras que 7 de 9 líneas celulares muy sensibles (GI50 < 50 nM) tuvieron niveles de Hec1 mayores que K562, la línea celular con la GI50 más baja. De manera similar, las líneas celulares sensibles al inhibidor de Hec1 110095 mostraron una elevación estadísticamente significativa (valor de $p < 0,0001$) de expresión de proteínas de Hec1 en relación con líneas celulares resistentes (figura 1C). La figura 1D muestra resultados similares de estudios con cuatro inhibidores diferentes de Hec1. El log de los datos de GI50 recogidos de ensayos de selección de líneas celulares de cuatro análogos de compuesto Hec1 (100951, 101001, 101015 y 110095) se representaron frente a niveles cuantificados de expresión de la proteína Hec1 y se utilizó una prueba de la t de 2 colas para determinar la significación en valores de p . Se encontró un valor de p de $4,32914 \times 10^{-17}$, lo que implica fuertemente que los niveles de expresión de Hec1 pueden usarse de manera eficaz como biomarcador en diseños para ensayos clínicos para un inhibidor de Hec1. En general, la expresión de Hec1 mostró una correlación positiva con la sensibilidad celular a inhibidores de Hec1. Estudios adicionales en células HeLa mostraron que la relación entre proteína Hec1 y expresión de ARN (como función de proteína total y ARN total, respectivamente), tal como se muestra en la figura 1E, es aproximadamente lineal. Esto sugiere que, ventajosamente, o bien la expresión de proteínas de Hec1 o bien la expresión de ARN de Hec1 pueden utilizarse eficazmente como biomarcador en diseños para ensayos clínicos para un inhibidor de Hec1.

Expresión de Hec1 en tipos y subtipos de muestra de cáncer clínico: los perfiles de expresión de todo el genoma muestran que Hec1 está regulado por incremento en mama, pulmón, hígado y células cerebrales y que la expresión de Hec1 se correlaciona con el grado de tumor y pronóstico. Se recogieron muestras de tejido de paciente con cáncer clínico y se analizaron para determinar sus niveles de expresión de Hec1. Los datos revelan niveles de expresión de Hec1 significativamente mayores en determinados tipos y subtipos de cáncer. La figura 2A y la figura 2B representan los datos de expresión de HEC(NDC80) obtenidos de las bases de datos GEO GSE8894 (figura 2A) y GSE14814 (figura 2B) para muestras de tumor de cáncer de pulmón que representan adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas, analizados y expresados como logaritmos de base 2 de intensidad de expresión en relación con tejido normal. En ambos conjuntos de datos, la expresión media del gen HEC(NDC80) está elevada en células de carcinoma de células escamosas. Se encontró una elevación de expresión de Hec1 similar en células de cáncer de colon (no mostrado). De manera similar, se obtuvieron datos de expresión de HEC(NDC80) de la base de datos GEO GSE 20685 para muestras de tumor de cáncer de mama de diversos subtipos moleculares, se analizaron y se expresaron como logaritmos de base 2 de intensidad de expresión en relación con tejido normal. HEC se sobreexpresa en cáncer de mama molecular subtipo I, tal como se muestra en su perfil de expresión génica (figura 2C). También se caracterizó la expresión de proteínas Hec1 en muestras de tumor de cáncer de mama aisladas de pacientes, como el subtipo molecular del cáncer de mama, y se resumen en la tabla 2. Los subtipos moleculares I y IV muestran expresión de proteínas de Hec1 elevada. También se enumeran propiedades de diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama clasificados en la tabla 1, que muestra gen de retinoblastoma (Rb) y p53 y estado de proteína en líneas celulares seleccionadas y enumera líneas celulares en orden de GI50 creciente. Estos resultados indican fuertemente que el tipo y/o el subtipo molecular de un tumor o línea de células tumorales puede ser un indicador crítico de selección adecuada de pacientes durante ensayos clínicos para el inhibidor de Hec1.

Subtipo molecular de cáncer de mama	Hec1	p84	actina
I	++	+++++	+++++
I	+	+++	+++
I	-	++	+
II	-	-	-
II	-	++	+++++
II	-	++++	++
III	-	+	++++
III	-	++	+++++

III	-	+++	+++++
IV	+	+++	+++++
IV	+	++	+++++
V	-	-	-
V	-	+	+
V	-	++++	+++
VI	-	+	+
VI	-	-	-
VI	-	-	-

Tabla 2

5 Correlación del estado de Rb y p53 con sensibilidad celular a inhibidores de Hec1: se descubrió Hec1 a través de su interacción con la proteína del retinoblastoma Rb. Esto sugiere que puede haber una relación entre el estado de Rb de líneas celulares de cáncer en el presente sistema de selección de fármacos (tabla 1) y sensibilidad al inhibidor de Hec1. Sorprendentemente, el patrón del estado de Rb y p53 en las presentes líneas celulares puede indicar un requisito para la presencia de una forma mutada de Rb y/o una forma mutada de p53. Tal como se muestra en la tabla 3, Rb mutante/anómalo como biomarcador individual es menos significativo que p53 mutado/anómalo, con valores de p de 0,3 y <0,005, respectivamente.

Expresión de Hec1			
	Total	Alta	Baja
Sensible	17	16	1
Resistente	2	0	2
Valor de p < 0,01			

Expresión de P53			
	Total	mutante	silvestre
Sensible	25	22	3
Resistente	5	1	4
Valor de p < 0,005			

Expresión de Hec1 +/- P53			
	Total	Alta	Baja
Sensible	25	25	0
Resistente	5	1	4
Valor de p < 0,0001			

Expresión de Rb			
	Total	mutante	silvestre
Sensible	25	7	18
Resistente	5	0	5
Valor de p = 0,3			

Expresión de Hec1 +/- Rb			
	Total	mutante	silvestre
Sensible	25	18	7
Resistente	5	0	5
Valor de p < 0,005			

Expresión de Rb +/- p53			
	Total	Alta	Baja
Sensible	25	23	2
Resistente	5	1	4
Valor de p < 0,005			

Expresión de Hec1 +/- Rb +/- p53			
	Total	mutante	silvestre
Sensible	25	25	0
Resistente	5	1	4
Valor de p < 0,0001			

Tabla 3

Se muestran resultados similares en la tabla 4, donde Rb mutante como biomarcador individual tiene un valor de p de >0,6, mientras que p53 mutante tiene un valor de p de <0,007.

	Alto Hec1/+ p53 mutante/+ Rb mutante	p53 mutante/ + Rb mutante	Rb mutante	p53 mutante	Alto Hec1
Total	31	31	30	30	18

Mutantes sensibles	23	22	7	20	14
No mutantes sensibles	1	2	17	3	2
Mutantes insensibles	2	2	0	2	0
No mutantes insensibles	5	5	5	5	2
Punto de corte de sensibilidad 101001	270 nM	270 nM	270 nM	270 nM	270 nM
Valor de p	0,000694	0,00268	0,6550545	0,006661	0,039216

Tabla 4

Para aclarar aún más el papel de estos supresores de tumores en la sensibilidad celular al inhibidor de Hec1, se usó ARNip para silenciar o reducir selectivamente la expresión de Rb y p53 en líneas celulares seleccionadas y se caracterizó el efecto sobre su sensibilidad al inhibidor de Hec1. Sorprendentemente, el silenciamiento de Rb indujo un aumento en la sensibilidad del inhibidor de Hec1 en varias líneas de células cancerosas que portaban Rb silvestre (MDA-MB-231, K562, ZR-75-1, T47D, HCT116), pero no tuvo efecto sobre líneas celulares con Rb mutado (HeLa) (figuras 3A-3B). La figura 3A muestra los resultados de los estudios de viabilidad de las células Rb MDA-MB-231 silvestres transfectadas con ARNip dirigidas a Rb (siRb) y ARNip de control, luego tratadas con el inhibidor de Hec1 101001; la sensibilidad celular se expresa en GI50 (μM). También se muestran los resultados de la cuantificación del ARN de Rb a partir de células transfectadas mediante PCR en tiempo real, y muestran una caída significativa en el ARN de Rb en células tratadas con ARNip. La figura 3B muestra los resultados de la transfección siRb de líneas celulares seleccionadas con Rb silvestre (MDA-MB-231, K562, ZR-75-1, T47D, A549, HCT116) o Rb mutado (HeLa) y tratadas como en la figura 3A; la sensibilidad celular se expresa como porcentaje de inhibición del crecimiento en relación con las células no tratadas con fármacos. Los lisados celulares de las células transfectadas se recogieron y se analizaron para determinar la proteína Rb mediante inmunotransferencia; las inmunotransferencias se muestran debajo de los gráficos de inhibición correspondientes. La actina se incluyó como control de carga.

El silenciamiento de p53 indujo efectos de sensibilización similares en células portadoras de p53 silvestre (A549, HCT116, ZR-75-1, U2OS), pero sorprendentemente no tuvo efecto sobre células portadoras de p53 mutado (MDA-MB-231, HeLa) tal como se muestra en las figuras 4A-4B. La figura 4A muestra los resultados de las células p53 silvestres (A549, HCT116) y mutantes (MDA-MB-231) transfectadas con ARNip dirigido a p53 (sip53) y luego tratadas con el compuesto inhibidor de Hec1 101001. Las células se analizaron para determinar la viabilidad y la sensibilidad celular expresadas en GI50 (nM). El ARN de las células transfectadas también se analizó para determinar el nivel de ARN de p53 mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El aumento de la sensibilidad de las células tratadas con sip53 se muestra por la disminución de GI50 de las células tratadas con sip53 con p53 silvestre, que no se observó en células con p53 mutado. De manera similar, la figura 4B muestra los resultados de la transfección de líneas celulares seleccionadas con p53 silvestre (A549, HCT116, ZR-75-1, U2OS) o p53 mutado (HeLa) con ARNip dirigido a p53 y tratado como en la figura 4A. La sensibilidad celular se expresa como porcentaje de inhibición del crecimiento en relación con las células no tratadas con fármacos. Resultados de inmunotransferencias de lisados celulares de células transfectadas para p53; las inmunotransferencias correspondientes se muestran debajo de los gráficos de inhibición correspondientes. En general, estos resultados sugieren que las células cancerosas con Rb y p53 deterioradas son más sensibles a los inhibidores de Hec1 a través de una ruta aún desconocida, que puede proporcionar biomarcadores adicionales útiles para guiar la selección de pacientes para la terapia clínica con inhibidores de Hec1.

Por tanto, debe apreciarse que se presentan tres biomarcadores para la selección de líneas celulares sensibles y pacientes clínicos para determinar la sensibilidad a inhibidores de Hec1 según el objeto de la invención. El aumento de la expresión de Hec1, Rb mutado y/o p53 mutado son indicadores de tumores y líneas celulares que son potencialmente susceptibles a inhibidores de Hec1. Estos factores pueden ser predictivos individualmente o en cualquier combinación. De manera sorprendente, el valor de p combinado para los tres biomarcadores es $<0,0001$ (tabla 3). Estos proporcionan una guía de selección para el diseño de estudios clínicos para seleccionar pacientes que más probablemente responden a la terapia con inhibidor de Hec1.

Eficacia de los inhibidores de Hec1 en relación con fármacos citotóxicos actuales: la sensibilidad de las células

5 derivadas de tumores al inhibidor de Hec1 y una selección de fármacos citotóxicos que se usan actualmente en el
 10 tratamiento del cáncer (en cuanto a GI50) se muestran en las tablas 5-7. La tabla 5 resume las GI50 de varias líneas
 celulares derivadas de cáncer de mama con respecto al inhibidor de Hec1 101001 y varios fármacos citotóxicos
 (paclitaxel, doxorubicina, topotecán y sorafenib). La tabla 6 muestra datos similares para varias líneas celulares
 derivadas de células de cáncer de hígado. De manera similar, la tabla 7 resume las GI50 de otras líneas celulares
 derivadas de cáncer con respecto al inhibidor de Hec1 101001 y paclitaxel, doxorubicina y topotecán. En su mayor
 parte, los inhibidores de Hec1 fueron más potentes (es decir, tenían una GI50 más baja) que los agentes citotóxicos
 seleccionados en líneas celulares seleccionadas. Sorprendentemente, los inhibidores de Hec1 también fueron
 eficaces en varias líneas celulares resistentes a fármacos, incluyendo las líneas celulares resistentes a taxol Mex-
 SA/Dx5 y NCI/ADR-Res y la línea celular resistente a Gleevec K562R, tal como se muestra en la tabla 8. Estos
 resultados proporcionan una base para el uso del inhibidor de Hec1 como alternativa a o en combinación con las
 pautas de administración terapéuticas con fármacos citotóxicos tales como, por ejemplo, taxol, doxorubicina,
 topotecán y Gleevec.

Líneas celulares de cáncer de mama	GI50 (nM)				
	101001	paclitaxel	doxorubicina	topotecán	sorafenib
MDA-MB-231	43,31	3,00	213,80	346,73	3044,00
MDA-MB-468	33,64	2,38	28,27	10,71	3171,67
MDA-MB-453	23,57	1,42	158,04	92,34	2521,00
T47D	17,09	3,19	11,94	9,43	1730,00
ZR-75-1	79,62	> 10 uM	92,88	36,32	4337,00
ZR-75-30	76,78	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Hs578T	143,03	8,39	711,30	4955,00	N.D.

15 Tabla 5

Líneas celulares de cáncer de hígado	GI50 (nM)				
	101001	paclitaxel	doxorubicina	topotecán	sorafenib
Huh-7	84,32	93,53	182,80	50,91	4501,00
PLC/PRF/5	91,61	8,58	69,72	174,40	3762,00
HepG2	272,67	> 50 uM	746,30	434,90	8254,00
Hep3B	96,06	9,47	247,70	422,40	3676,00

Tabla 6

Otras líneas celulares de cáncer	GI50 (nM)				
	101001	paclitaxel	doxorubicina	topotecán	sorafenib
K562	13,48	3,46	36,22	36,12	N.D.
HeLa	15,83	7,80	242,00	636,55	N.D.

HCT116	38,94	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
COLO205	40,23	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
U2OS	139,30	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
U-937	22,03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Tabla 7

Línea celular	Origen	GI50 de 101001 (nM)	GI50 de 110095 (nM)	GI50 de 100951 (nM)	GI50 de 101015 (nM)	GI50 de paclitaxel (nM)
MEX-SA/Dx5	Sarcoma uterino resistente a múltiples fármacos	34,89	7,27	75,29	34,89	6247
NCI/ADR-RES	Sarcoma uterino resistente a múltiples fármacos	28,5	19,46	52,58	21,65	2329
K562R	Leucemia mielógena resistente a Gleevec	29,57	10,44	74,44	26,01	34,45

Tabla 8

5

Efectos sinérgicos del inhibidor de Hec1 con fármacos citotóxicos: la terapia de combinación es un enfoque prometedor para un tratamiento más eficaz de los pacientes con cáncer. Los fármacos que pueden dirigirse a vías no alcanzadas por otros fármacos anticancerosos actuales tienen un potencial clínico aún mejor para incorporarse a las pautas de administración terapéuticas actuales. Tal como se indicó anteriormente, los resultados de los estudios con un solo fármaco sugieren fuertemente que los inhibidores de Hec1 pueden ser eficaces en tales terapias de combinación. Para investigar los posibles enfoques terapéuticos de combinación clínica para los inhibidores de Hec1, se caracterizaron los efectos sinérgicos de los inhibidores de Hec1 con varios agentes citotóxicos actualmente disponibles utilizados en la terapia contra el cáncer. Las células cancerosas que responden a los inhibidores de Hec1 usadas para la selección se trataron con una mezcla de inhibidor de Hec1 y un fármaco anticanceroso seleccionado en razones de concentración apropiadas y se evaluaron para determinar la viabilidad celular. Se calculó un índice de combinación (IC) a partir de las GI50 obtenidas tal como se describió anteriormente para representar efectos aditivos (IC = aproximadamente 1), sinérgicos (IC <1) o antagónicos (IC > 1). La tabla 9 resume los resultados de los estudios de sinergia en varias líneas celulares derivadas de cáncer tratadas con el inhibidor de Hec1 110001 en combinación con fármacos citotóxicos. La tabla 10 resume los resultados de un estudio similar realizado con el inhibidor de Hec1 110095. De manera similar, la tabla 11 resume los valores del índice de combinación (IC) obtenidos para los inhibidores de Hec1 100951 (0951), 101001 (1001), 101015 (1015) y 110095 (0095) y los fármacos citotóxicos para las líneas celulares de leucemia, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama y cáncer de hígado. Se identificaron efectos sinérgicos significativos de los inhibidores de Hec1 (es decir, IC <1) con taxol, doxorubicina y topotecán en muchas de las líneas celulares analizadas. Esto sugiere que los inhibidores de Hec1 pueden proporcionar una modalidad terapéutica adicional para el tratamiento de la enfermedad neoplásica o la inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer cuando se añaden a las pautas de administración actuales de fármacos citotóxicos.

El mecanismo del inhibidor de Hec1 indujo muerte celular: P53 se conoce como un importante regulador del ciclo celular en las fases G1 y G2, y controla la apoptosis en respuesta a estrés y señales proliferativas y anómalas. Dado que la mayoría de las líneas celulares sensibles al inhibidor de Hec1 que los inventores han descubierto tienen p53 mutante, podría especularse que las rutas apoptóticas independientes de p53 pueden participar en la ruta de muerte celular inducida por el inhibidor de Hec1. P73 es un miembro de la familia p53 que media la apoptosis y reemplaza la función de p53 en células deficientes en p53. P73 es, por tanto, un candidato potencial para una molécula que media la apoptosis que conduce a la muerte celular inducida por el inhibidor de Hec1. Para investigar esto, las células sensibles a los medicamentos (HeLa) y resistentes a los medicamentos (A549) que portan proteínas p53 mutantes se trataron con el inhibidor de Hec1 110095 durante períodos de tiempo variables. Los resultados de las inmunotransferencias para p73 fosforilado muestran que los inhibidores de Hec1 indujeron la fosforilación

35

dependiente del tiempo de p73 en células tratadas, alcanzando un máximo a las 48 horas después del tratamiento farmacológico (figura 5A). Tal fosforilación sugiere que los inhibidores de Hec1 pueden actuar para inducir la muerte celular, al menos en parte, modulando la actividad de p73.

5 De manera similar, se trataron células HeLa (figura 5B) durante 24 ó 48 horas con inhibidores de Hec1 seleccionados 110091 (91), 110093 (93), 110095 (95), a 1 μ M y se inmunotransfirieron lisados para los marcadores apoptóticos caspasa3 y PARP y los marcadores anti-apoptóticos Mcl-1, XIAP, y Bcl-2. Se muestra actina como control de carga. Las células A549 se trataron de manera similar con inhibidores de Hec1 100951(0951), 101001(1001), 101015(1015), 110078(0078) y 110079(0079), y los resultados

Línea celular, (origen)	Fármaco citotóxico, (GI50)	GI50 de 110001	Razón usada de fármaco citotóxico: 110095	Índice de combinación	Sinergia
K562 (leucemia)	doxorubicina, (36,22 nM)	43,77 nM	0,83	0,66	Sí
MB-468 (cáncer de mama)	doxorubicina, (27,01 nM)	33,64 nM	0,80	0,87	Sí
Huh7 (cáncer de hígado)	doxorubicina, (182,80 nM)	84,32 nM	2,17	0,73	Sí
MB-231 (cáncer de mama)	topotecán, (346,73 nM)	43,31 nM	8,01	0,78	Sí
MB-468 (cáncer de mama)	topotecán, (10,71 nM)	33,64 nM	0,32	0,74	Sí
Huh7 (cáncer de hígado)	paclitaxel, (93,53 nM)	84,32 nM	1,109	0,28	Sí
MB-231 (cáncer de mama)	paclitaxel, (4,91 nM)	42,48 nM	0,116	0,68	Sí
K562 (leucemia)	paclitaxel, (9,93 nM)	40,65 nM	0,24	0,73	Sí
Huh7 (cáncer de hígado)	sorafenib, (4501 nM)	84,32 nM	53,38	1,66	Antagonista
Hep3B (cáncer de hígado)	sorafenib, (3676 nM)	103,55 nM	35,50	1,50	Antagonista
Huh7 (cáncer de hígado)	KXO1, (27,16 nM)	84,32 nM	0,32	1,31	Aditivo

10

Tabla 9

se resumen en la figura 5C. Se muestran estudios similares que usan un inhibidor diferente de Hec1 en la figura 5D, que ilustra los resultados del tratamiento de líneas celulares HeLa y A549 con inhibidor de Hec1 101001. El tratamiento con inhibidor de Hec1 condujo a activación de caspasas apoptóticas en células que responden al fármaco (HeLa) (figura 5B, figura 5D). Un tratamiento similar de una línea celular resistente (A549) no mostró una respuesta similar (figura 5C, figura 5D). Esto sugiere que en células de p53 mutantes (HeLa), los inhibidores de Hec1 pueden inducir activación de p73 para desencadenar apoptosis dependiente de p73 que condujo a muerte celular inducida por el fármaco.

15

Línea celular, (origen)	Fármaco citotóxico, (GI50)	GI50 de 110095	Razón usada de fármaco citotóxico: 110095	Índice de combinación	Sinergia
K562 (leucemia)	doxorubicina, (36,22 nM)	28,23 nM	1,28	0,49	Sí
MB-468 (cáncer de	doxorubicina, (27,01 nM)	21,12 nM	1,28	0,87	Sí

mama)					
Huh7 (cáncer de hígado)	topotecán, (187,20 nM)	48,9 nM	3,74	0,76	Sí
MB-231 (cáncer de mama)	topotecán, (346,73 nM)	16,48 nM	21,04	0,71	Sí
MB-468 (cáncer de mama)	topotecán, (10,71 nM)	21,12 nM	0,51	0,88	Sí
Huh7 (cáncer de hígado)	topotecán, (50,91 nM)	34,98 nM	1,46	0,75	Sí
Huh7 (cáncer de hígado)	paclitaxel, (30,03 nM)	34,98 nM	0,86	0,65	Sí
MEX- SA/Dx5 (sarcoma)	paclitaxel, (6247 nM)	19,46 nM	321,02	1,41	No
NCI/ADR- RES (sarcoma)	paclitaxel, (2329 nM)	10,44 nM	223,08	0,82	Sí
K562R (leucemia)	paclitaxel, (34,45 nM)	7,27 nM	4,74	0,65	Sí
Huh7 (cáncer de hígado)	sorafenib, (4501,00 nM)	48,9 nM	92,04	1,05	Aditivo
Huh7 (cáncer de hígado)	KXO1, (27,16 nM)	48,9 nM	0,56	0,96	Aditivo

Tabla 10

5 Mecanismo para respuesta diferencial al inhibidor de Hec1: Hec1 y Nek2 están regulados por el ciclo celular y se encuentra que alcanzan su nivel de expresión más alto durante la fase G2/M. Dado que algunas líneas celulares son menos sensibles al tratamiento con inhibidor de Hec1, la regulación diferencial de tales rutas de Hec1/Nek2 puede ser un factor en las respuestas diferenciales celulares a inhibidores de Hec1.

Origen:	Leucemia				Cáncer de cuello uterino			
Línea celular:	K562				HeLa			
Fármaco	0951	1001	1015	0095	0951	1001	1015	0095
Taxol	0,67	0,62	0,62	1,64	1,04	1,21	1,01	1,22
Doxorrubicina	0,52	0,66	0,62	0,49	3,31	4,30	6,83	1,55
Topotecán	0,47	1,65	1,12	1,38	2,15	2,18	1,58	1,90
Origen:	Cáncer de mama				Cáncer de mama			
Línea celular:	MB-231				MB-468			
Fármaco	0951	1001	1015	0095	0951	1001	1015	0095
Taxol	0,51	0,68	0,98	1,21	1,36	1,01	1,16	1,08
Doxorrubicina	1,33	1,25	1,75	1,26	0,77	0,87	1,23	0,87
Topotecán	0,75	0,78	0,85	0,71	0,84	0,74	0,74	0,88
Origen:	Cáncer de hígado				Cáncer de hígado			
Línea celular:	Huh7				PCL/PRF/5			
Fármaco	0951	1001	1015	0095	0951	1001	1015	0095
Taxol	0,20	0,31	0,32	1,05	1,19	0,85	0,99	0,81
Doxorrubicina	0,34	0,73	0,54	0,76	1,92	1,27	1,65	2,31
Topotecán	1,08	1,63	0,62	0,75	2,94	4,37	1,17	2,83
KX01	0,99	1,31	1,08	1,36	1,69	2,19	1,31	1,08
Sorafenib	0,97	1,15	1,08	0,96	0,74	0,68	1,15	1,41
Origen:	Cáncer de hígado				Cáncer de hígado			
Línea celular:	HepG2				Hep3B			
Fármaco	0951	1001	1015	0095	0951	1001	1015	0095
Taxol	CI50 resistente a taxol > 10 uM				1,54	1,59	2,38	2,40
Doxorrubicina	2,58	2,13	1,74	3,00	3,99	1,71	2,00	2,27
Topotecán	1,89	2,24	1,92	3,03	1,76	1,58	1,05	1,48
KX01	1,71	1,70	1,68	2,32	2,14	1,86	2,32	2,79
Sorafenib	2,15	0,78	0,89	1,88	1,45	1,24	1,91	1,20

Tabla 11

Para investigar esta posibilidad, se sincronizaron células que responden al fármaco (HeLa, MDA-MB-468, HCT116) y células resistentes (A549) mediante inanición y se caracterizó la expresión de Hec1 y Nek2 a 1(G1), 27(G2), 32(G32) y 48(G48) horas. Los patrones de expresión diferencial entre Hec1 y Nek2 son evidentes, lo que indica diferencias en la regulación de las rutas de Hec1/Nek2 (figura 6A). Se trataron las células con compuesto de Hec1 110095 a la concentración indicada durante 48 horas y se caracterizó la expresión de Nek2 mediante inmunotransferencia (figura 6B). El tratamiento con inhibidor de Hec1 condujo a degradación de Nek2 en líneas celulares sensibles; sin embargo este efecto no se observa en la línea celular resistente (A549) (figura 6B). Esto

sugiere que las líneas celulares resistentes al inhibidor de Hec1 y sensibles al inhibidor de Hec1 pueden regular (o utilizar) las rutas de Hec/Nek2 de manera diferente. Además, se trataron células que responden al fármaco (HeLa) con inhibidor de Hec1 110095 (095) durante los diferentes periodos de tiempo y se caracterizó el contenido de ciclina B1 y ciclina D1 mediante inmunotransferencia (figura 6C). Los niveles de ciclina B1 y ciclina D1 se regularon por disminución en células que responden al fármaco tratadas con inhibidor de Hec1. Esto sugiere que líneas celulares con diferente contexto celular tienen rutas de ciclo celular diferenciales que permiten a células seleccionadas escapar de la muerte celular inducida por el compuesto de Hec1. La identificación de rutas del ciclo celular o regulatorias características (por ejemplo, caracterización de una ruta de Hec1/Nek2 y/o regulación de ciclina B1 y ciclina D1) puede proporcionar identificación de una enfermedad neoplásica y/o línea celular que es sensible a los inhibidores de Hec1.

También se ha demostrado que la expresión de Hec1 se correlaciona con el grado del tumor y el pronóstico. Por ejemplo, Hec1 es parte del predictor del pronóstico del cáncer de mama de un resultado terapéutico pobre, en el que los predictores del pronóstico significativo en el análisis univariante fueron la ciclina B1, BUB1, HEC y la firma de 11 genes. Esto resalta la importancia del uso de potentes inhibidores moleculares pequeños de Hec1 en pacientes con cáncer de mama. Los tipos y subtipos de cáncer pueden proporcionar una guía de selección para el diseño de estudios clínicos para seleccionar a los pacientes que es más probable que respondan a la terapia con inhibidores de Hec1, ya que los tipos y subtipos de cáncer con expresión elevada del gen Hec1 pueden ser más susceptibles a los inhibidores de Hec1 (tal como se muestran mediante los subtipos moleculares de cáncer de mama I y IV, anteriormente).

Funcionalmente, Hec1 es un componente del cinetocoro mitótico que se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer y conduce a un fenotipo tumoral. La expresión de Hec1 durante el ciclo celular está estrechamente regulada tanto en las células normales como en las células transformadas, sin embargo, el reclutamiento de cinetocoro de Hec1 aumenta en las líneas celulares de cáncer. Como se sabe, el silenciamiento del gen del retinoblastoma (Rb) aumentó la expresión de proteína y ARNm de Hec1. También se sabe que el silenciamiento de Rb y la desregulación de los genes diana RB/E2F aumentan la sensibilidad a las dosis terapéuticas de los agentes que dañan el ADN en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, T47D y ZR-75-1. El aumento de la aneuploidía y la inestabilidad cromosómica en las células cancerosas defectuosas de RB debido al aumento de la expresión de Hec1 puede, por tanto, contribuir al aumento observado en la sensibilidad a los inhibidores de Hec1 en células cancerosas con genotipos de Rb mutantes. El genotipado de Rb y/o genes relacionados puede proporcionar una guía de selección para el diseño de estudios clínicos para seleccionar pacientes y/o líneas celulares que probablemente respondan a la terapia con inhibidores de Hec1.

Si bien los perfiles de expresión de RB y p53 y las GI50 de inhibidores de Hec1 de las líneas celulares seleccionadas del fármaco sugieren que un RB mutado o un p53 mutado es un factor potenciador de la sensibilidad del inhibidor de Hec1, no es evidente que sea la falta inherente de p53 o función de ganancia de p53 mutante que sensibiliza las células. Por ejemplo, las células MDA-MB-361 no expresan proteínas p53, pero se encontró que no responden a los inhibidores de Hec1 (es decir, GI50 > 10 uM). p53 silvestre es un supresor tumoral que protege las células contra la proliferación anómala. Si bien los estudios iniciales identificaron erróneamente células con formas de p53 mutantes y se malinterpretó p53 como un oncogén, investigaciones posteriores demostraron que la sobreproducción amplia de proteínas p53 mutantes era características del cáncer y se exacerbaban con la progresión del tumor. La sobreexpresión de p53 mutante en tales casos dio como resultado células altamente tumorigénicas. De manera similar, la expresión de equivalentes murinos de p53 mutante de punto caliente humano produjo tumores con inestabilidad genómica aumentada, acompañada de aneuploidía, amplificación anómala de centrosoma y translocaciones de cromosomas no recíprocos. Esto sugiere que las formas de p53 mutadas pueden por sí mismas tener un papel activo en el mecanismo inhibidor de los inhibidores de Hec1. El genotipado de p53 y/o genes relacionados puede proporcionar una guía de selección para el diseño de estudios clínicos para seleccionar pacientes y/o líneas celulares que probablemente respondan a la terapia con inhibidores de Hec1.

Tal como se indicó anteriormente, la presencia de p53 mutante está asociada con la progresión tumoral, un efecto de ganancia de función (GOF). Muchos efectos de GOF de p53 mutante están asociados con su capacidad para unirse y/o inactivar proteínas de la familia p53, tal como p63 y p73. P73 puede reemplazar las funciones de mantenimiento del genoma de p53 en células deficientes en p53. Tal como se indicó anteriormente, la selección con inhibidores de Hec1 para identificar líneas celulares sensibles mostró que la mayoría de las líneas celulares sensibles tienen p53 mutante. Esto sugiere que la muerte celular inducida por el fármaco de Hec1 puede producirse a través de una o más rutas independientes de p53. Se sabe que las células de p53 mutantes tienen apoptosis mediada por p73/p63 deteriorada. En las células tumorales de p53 mutante, p73 y p63 no pueden reclutar sus genes diana; la existencia de complejos proteicos de p53 mutante, p73 y p63 puede afectar negativamente la quimiosensibilidad de las células cancerosas. Los inventores especulan que la muerte celular inducida por fármacos en el contexto del inhibidor de Hec1 puede producirse a través de la apoptosis dependiente de p73. En este sentido, los inventores especulan además que un mecanismo en la muerte celular inducida por el inhibidor de Hec1 puede implicar la interrupción de una o más interacciones entre p53 mutante y p73 para promover la activación de p73, lo que conduce a la apoptosis dependiente de p73. Curiosamente, el tratamiento de células con inhibidores de Hec1 indujo tanto marcadores de caspasa apoptótica como fosforilación de p73, lo que sugiere fuertemente la activación de una ruta apoptótica dependiente de p73. Sin embargo, las funciones complejas de p53 pueden diferir en diversos contextos celulares, y las relaciones entre Hec1, los inhibidores de Hec1 y p53 aún no se han dilucidado por

completo. Otros compuestos, composiciones y experimentos se proporcionan en el documento WO 2011/115998.

Lista de secuencias

- <110> Taivex Therapeutics Corporation
- 5 <120> BIOMARCADORES PARA CÁNCERES QUE RESPONDEN A MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DE HEC1
- <130> 102099.0001PCT
- <150> Documento US 61/562.177
- <151> 21-11-2011
- <160> 6
- 10 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 15 <220>
- <223> ADN sintético
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(26)
- 20 <223> cebador directo de GAPDH
- <400> 1
- ggtttacatg ttccaatatg attcca 26
- <210> 2
- <211> 23
- 25 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> ADN sintético
- <220>
- 30 <221> misc_feature
- <222> (1)..(23)
- <223> cebador inverso de GAPDH
- <400> 2
- atgggatttc cattgatgac aag 23
- 35 <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> cebador directo de Rb
 <400> 3
 gcagtatgct tccaccaggc 20
 10 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> ADN sintético
 <220>
 <221> misc-feautre
 <222> (1)..(21)
 <223> cebador inverso RB
 20 <400> 4
 aagggttcg aggaatgtga g 21
 <210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(17)
 <223> cebador directo de p53
 <400> 5
 gccccaggagg agcacta 17
 <210> 6
 35 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (1)..(19)

<223> cebador inverso de p53

<400> 6

gggagaggag ctggtgtg

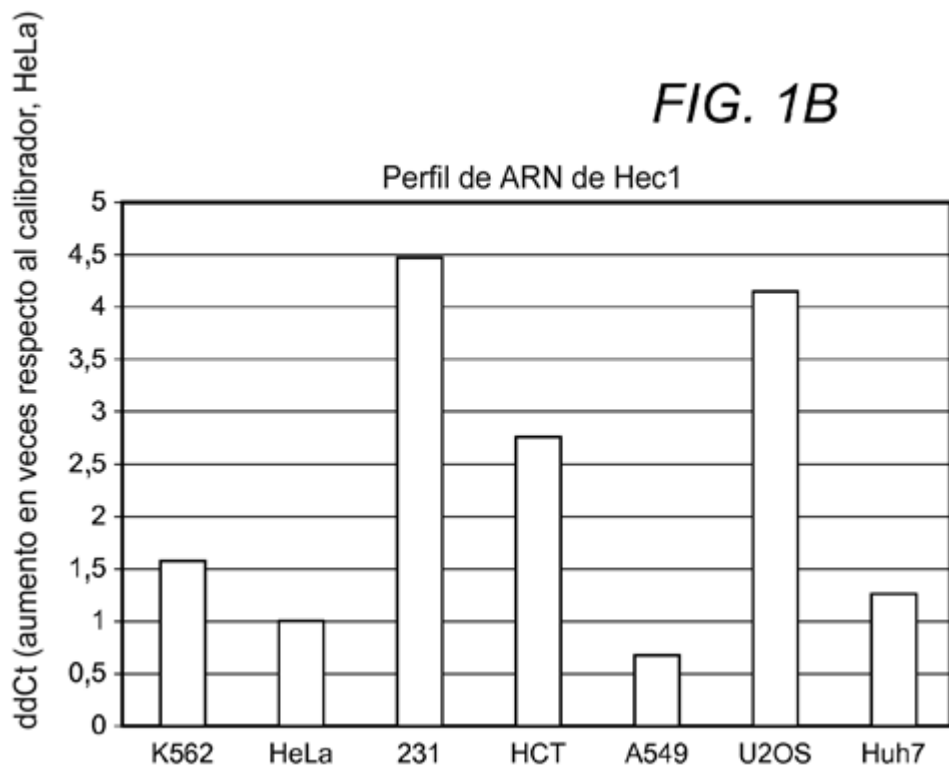
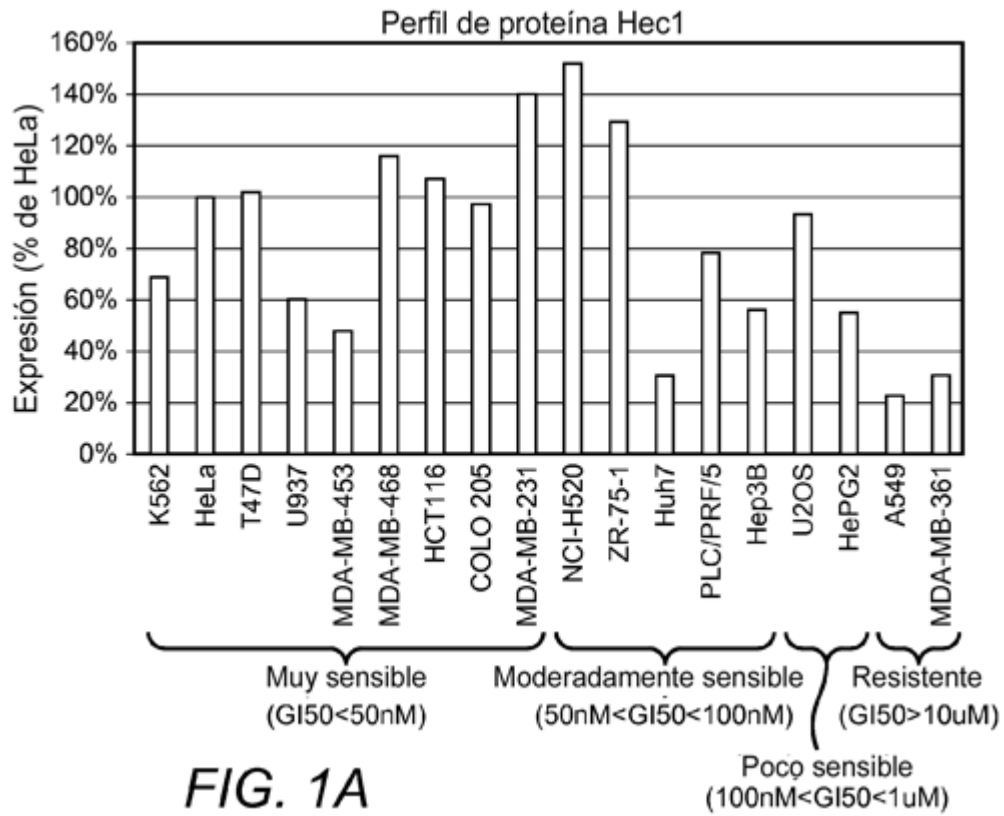
19

10

REIVINDICACIONES

1. Método de determinación de la sensibilidad de una célula neoplásica a un inhibidor de Hec1 en la evaluación de una enfermedad neoplásica, que comprende:
 - usar una muestra de un paciente que comprende una célula neoplásica o células neoplásicas;
- 5 formar un complejo detectable de cada uno de Hec1, Rb y p53, en el que cada uno de Hec1, Rb y p53 se deriva de la muestra;
 - usar el complejo detectable de Hec1 para determinar el nivel de expresión de Hec1, usar el complejo detectable de Rb para determinar el estado de Rb, y usar el complejo detectable de p53 para determinar el estado de p53, para obtener un resultado de prueba; y
- 10 comparar el resultado de prueba con un resultado de referencia de una célula no neoplásica que incluye nivel de expresión de Hec1, estado de Rb y estado de p53 de la célula no neoplásica para predecir de ese modo la sensibilidad de la célula neoplásica al inhibidor de Hec1, en el que un nivel de expresión aumentado de Hec1 en relación con el correspondiente resultado de referencia y una forma mutada o delecionada de cada uno de Rb y p53 en relación con el correspondiente resultado de referencia son
 - 15 indicativos de la sensibilidad de la célula neoplásica al inhibidor de Hec1; y
 - en el que el inhibidor de Hec1 se selecciona del grupo que consiste en
 - N-(4-(4-isopropoxi-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (100951),
 - N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101001),
 - 2-fluoro-N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101015),
 - 20 N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iloxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (Hec1 10091),
 - N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110095), y
 - N-(4-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110096), y sus formas de sal.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación comprende:
 - 25 - cuantificación de un ácido nucleico que codifica para Hec1, Rb, o p53, o
 - secuenciación o hibridación o una combinación de ambos de un ácido nucleico que codifica para Hec1, Rb, o p53, o
 - cuantificación de la proteína Hec1, proteína Rb o proteína p53.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la enfermedad neoplásica se selecciona de cáncer de
 - 30 mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon o cáncer de hígado.
4. Inhibidor de Hec1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, en el que la enfermedad neoplásica contiene célula(s) neoplásica(s) que se determina que es/son sensible(s) al inhibidor de Hec1 mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y en el que el inhibidor de Hec1 se
 - 35 selecciona del grupo que consiste en
 - N-(4-(4-isopropoxi-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (100951),
 - N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101001),
 - 2-fluoro-N-(4-(4-(4-metoxifenoxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (101015),
 - N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iloxi)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (Hec1 10091),
 - N-(4-(4-(5-(2-metoxietoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110095), y
 - 40 N-(4-(4-(5-(2-(dimetilamino)etoxi)pirazin-2-iltio)-2,6-dimetilfenil)tiazol-2-il)isonicotinamida (110096), y sus formas de sal.
5. Inhibidor de Hec1 para su uso según la reivindicación 4, en el que la enfermedad neoplásica se selecciona de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon o cáncer de hígado.
6. Inhibidor de Hec1 para su uso según la reivindicación 4, que comprende además el uso de un segundo agente quimioterápico seleccionado del grupo que consiste en taxol, doxorubicina y topotecán.
- 45

7. Inhibidor de Hec1 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que la enfermedad neoplásica es resistente a tratamiento con imatinib.



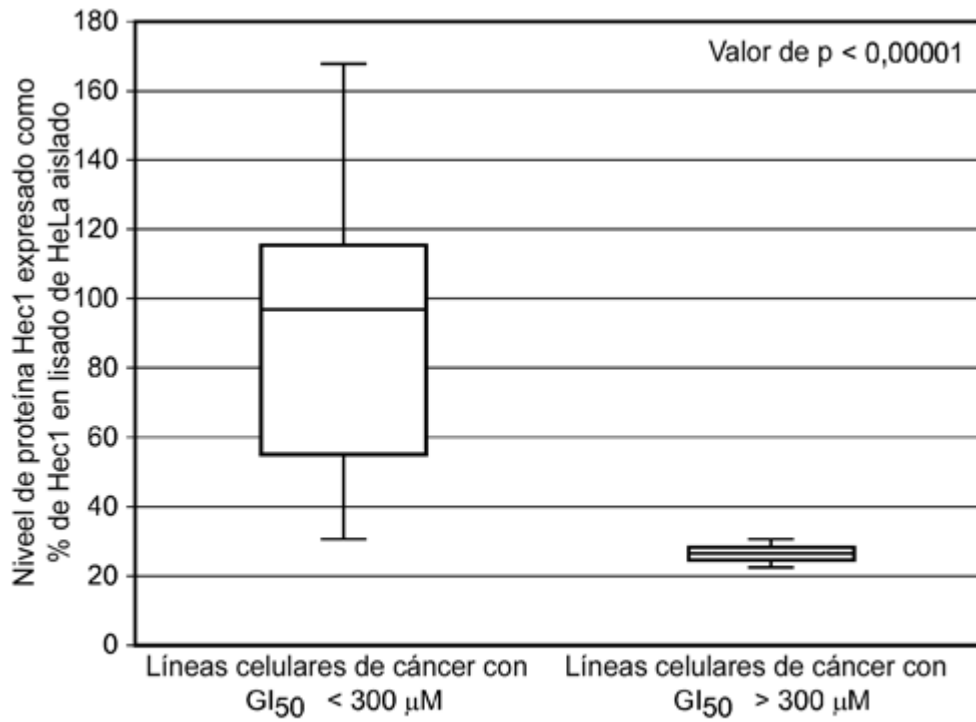


FIG. 1C

FIG. 1E

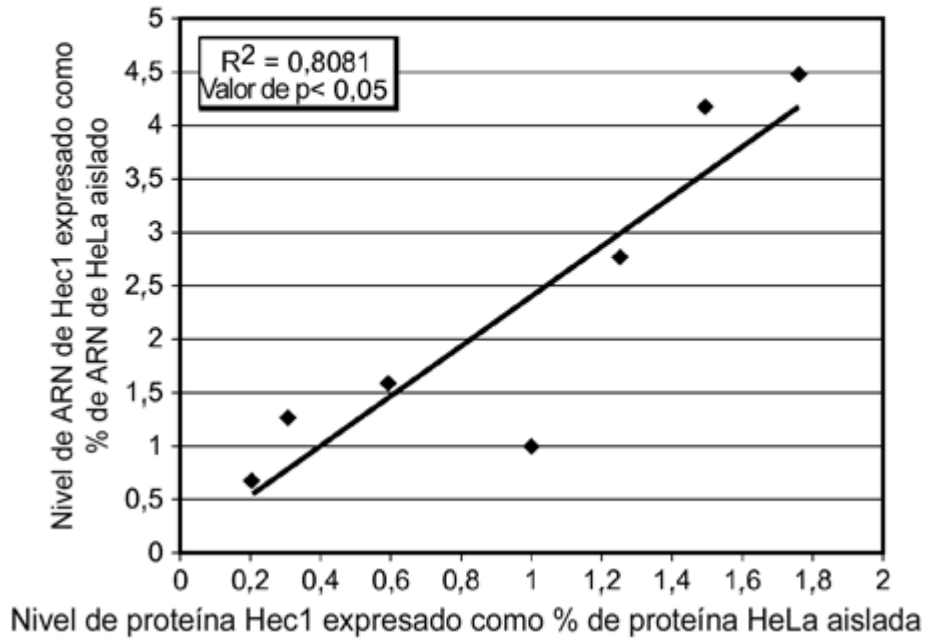
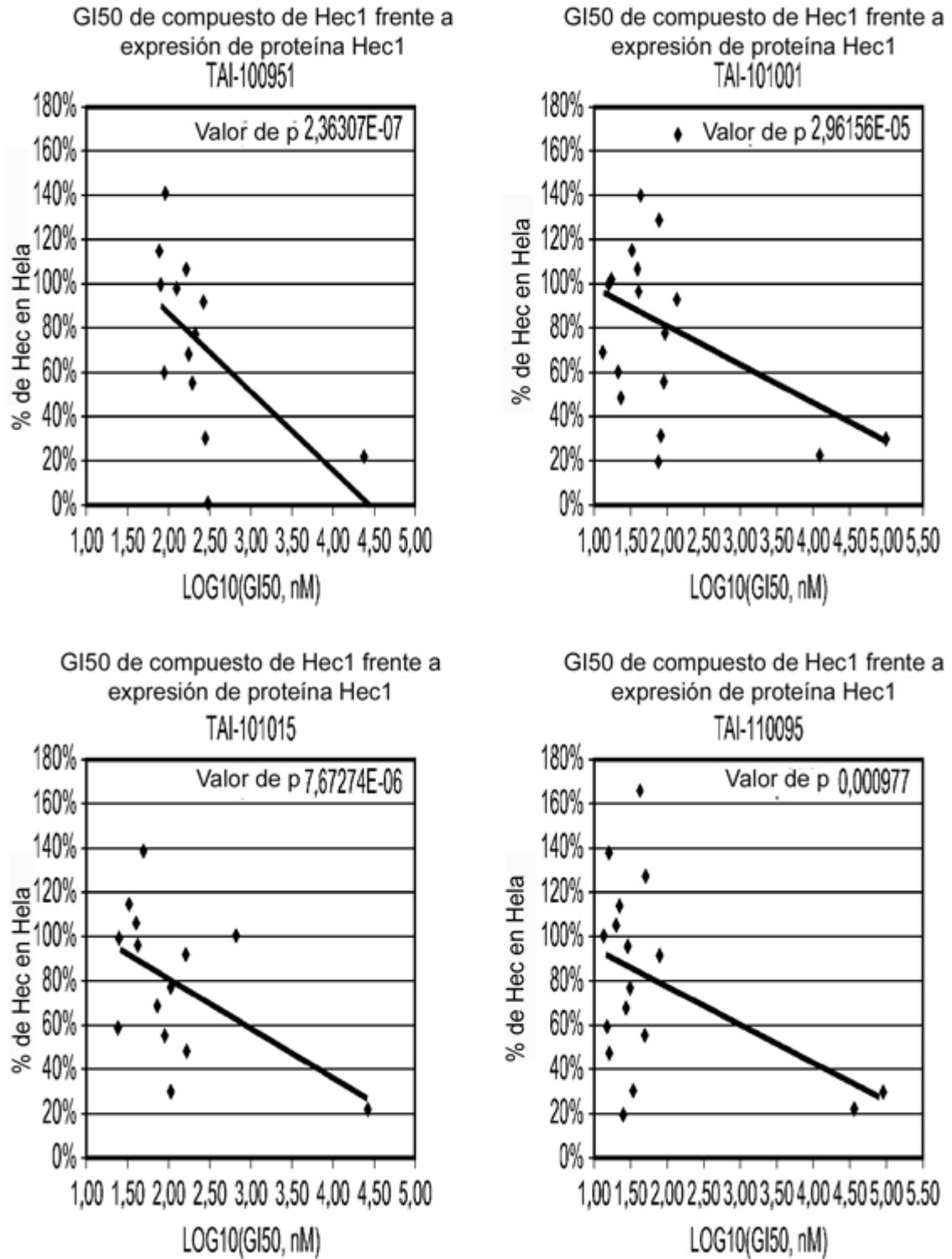
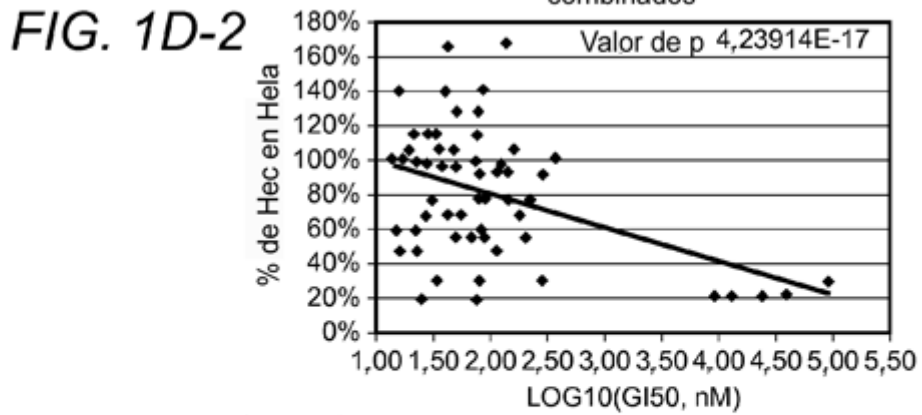


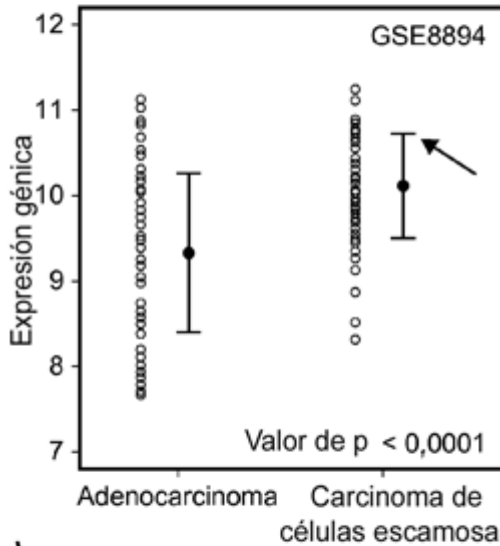
FIG. 1D-1



GI50 de compuesto de Hec-1 frente a expresión de proteína Hec1
TAI-101015, TAI-101001, TAI-101015, TAI-110095
combinados



Expresión de HEC (NDC80) en
cáncer de pulmón humano

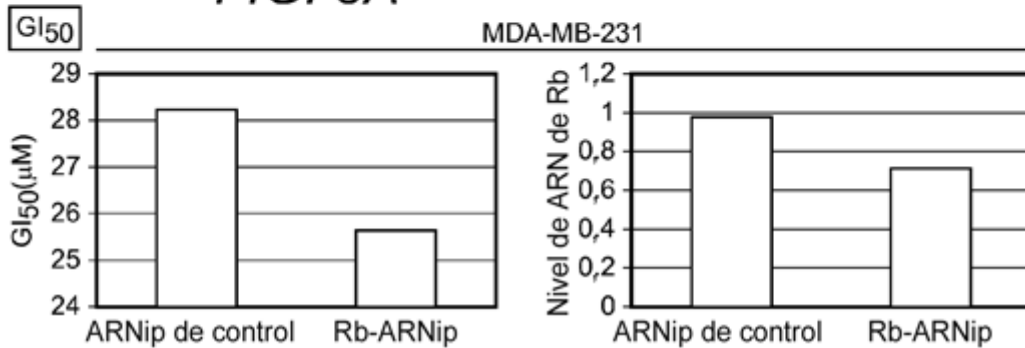


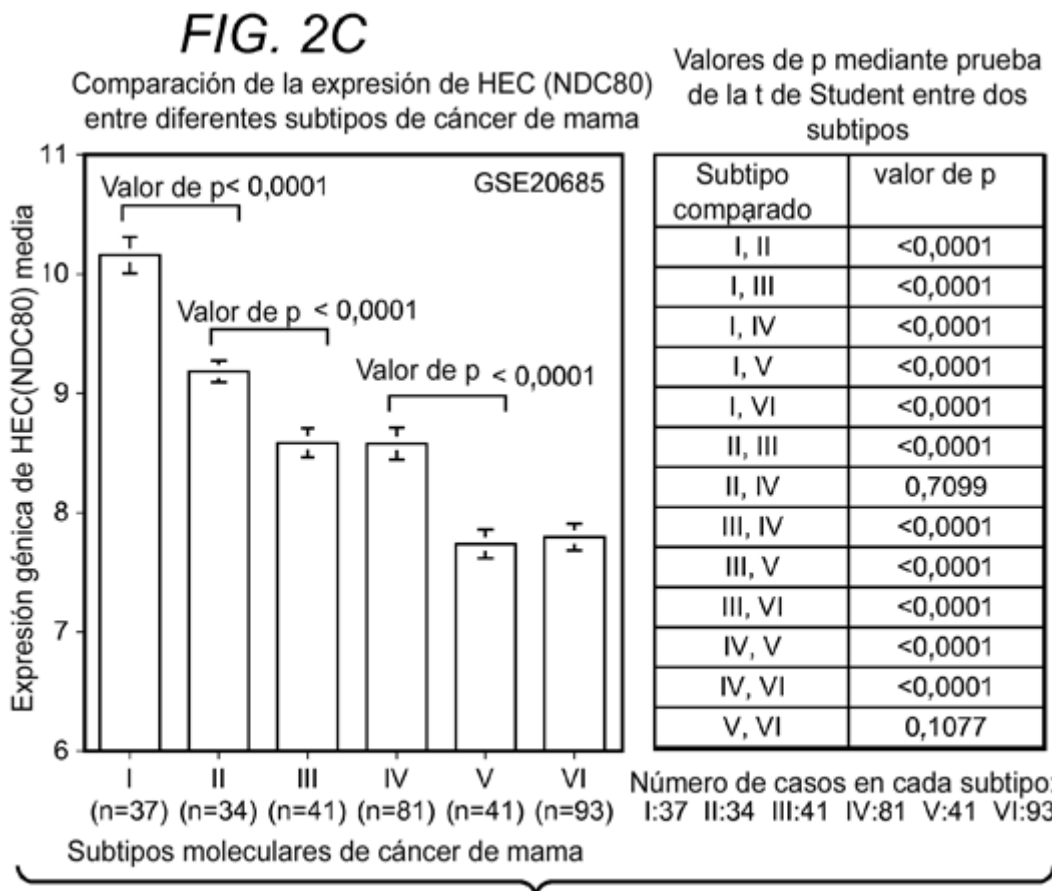
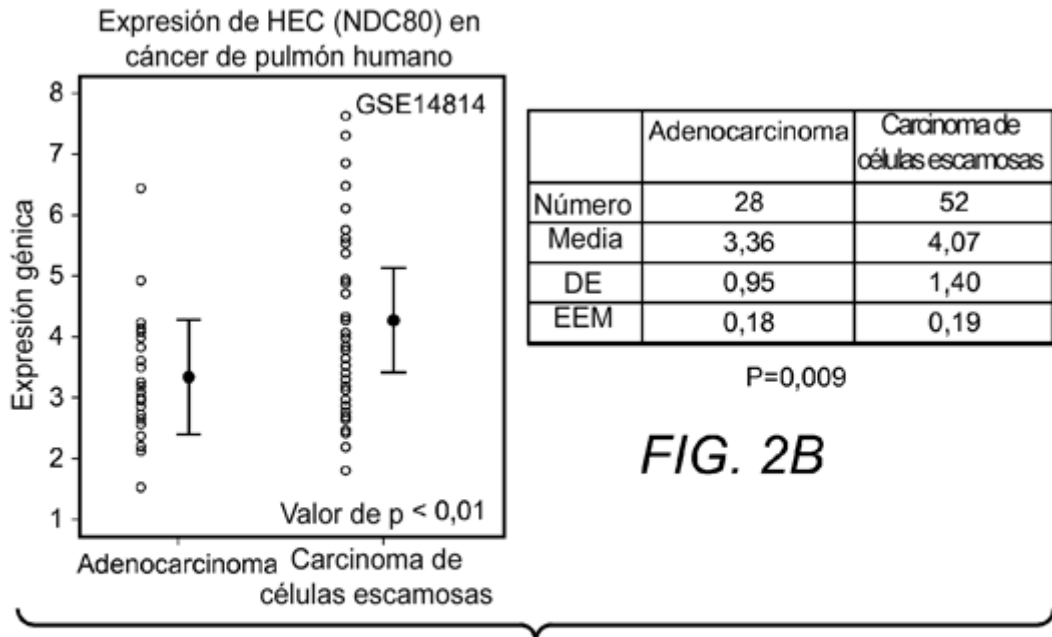
	Adenocarcinoma	Carcinoma de células escamosas
Número	62	76
Media	9,34	10,12
DE	0,93	0,61
EEM	0,12	0,07

$P=1,325 \times 10^{-7}$

FIG. 2A

FIG. 3A





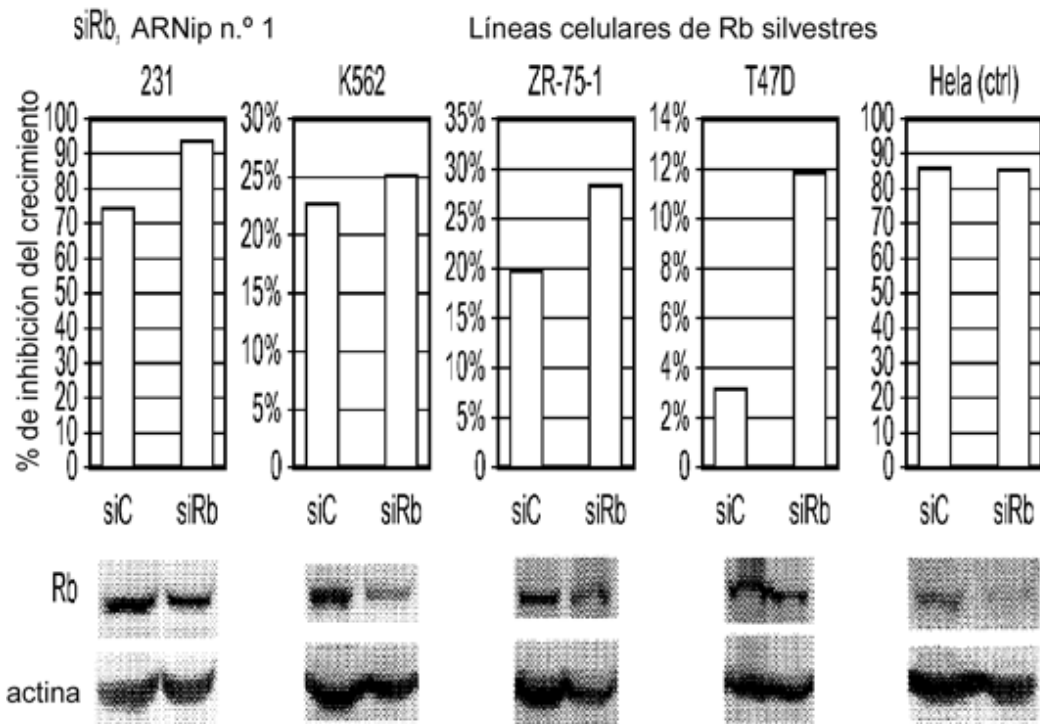


FIG. 3B

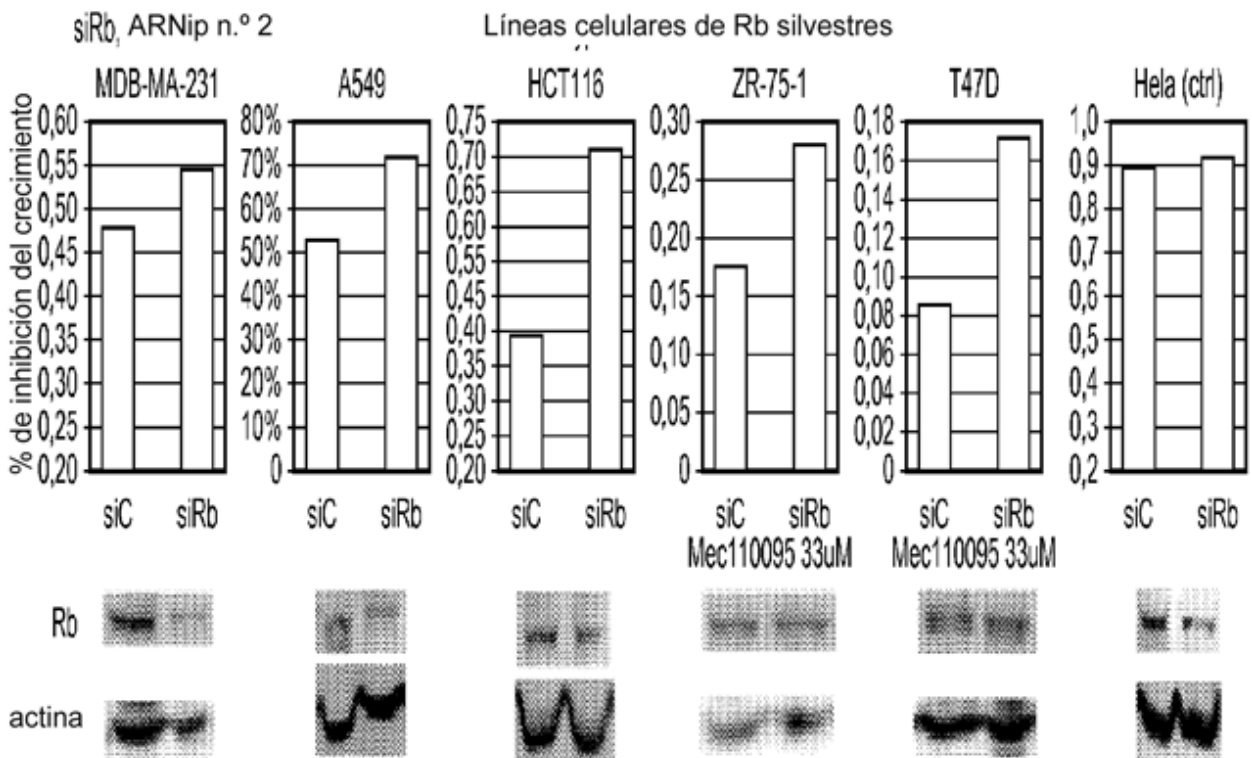


FIG. 4A

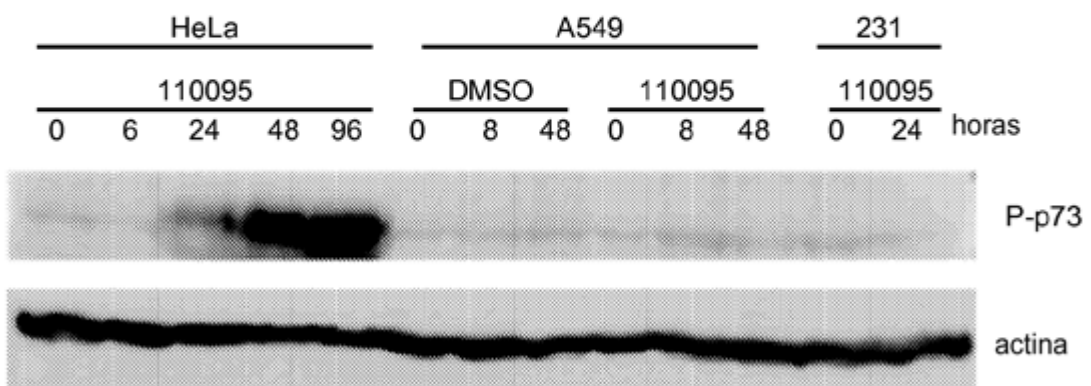
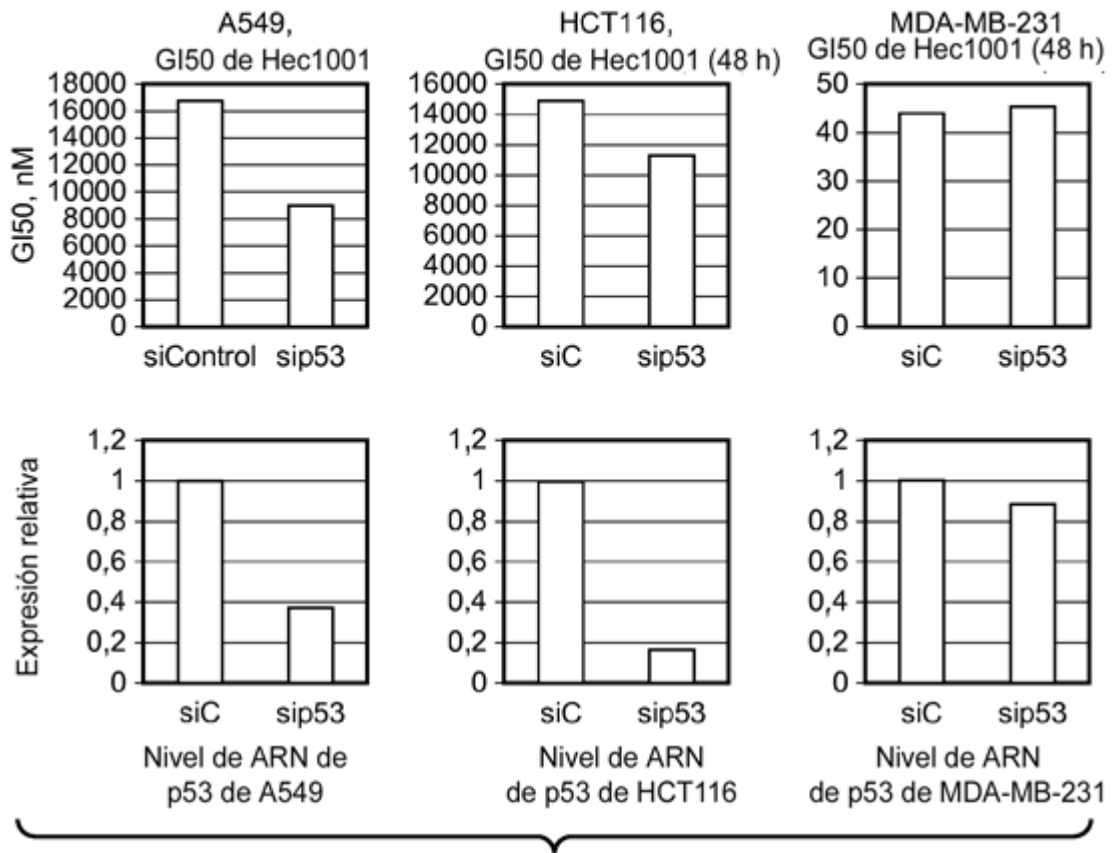


FIG. 5A

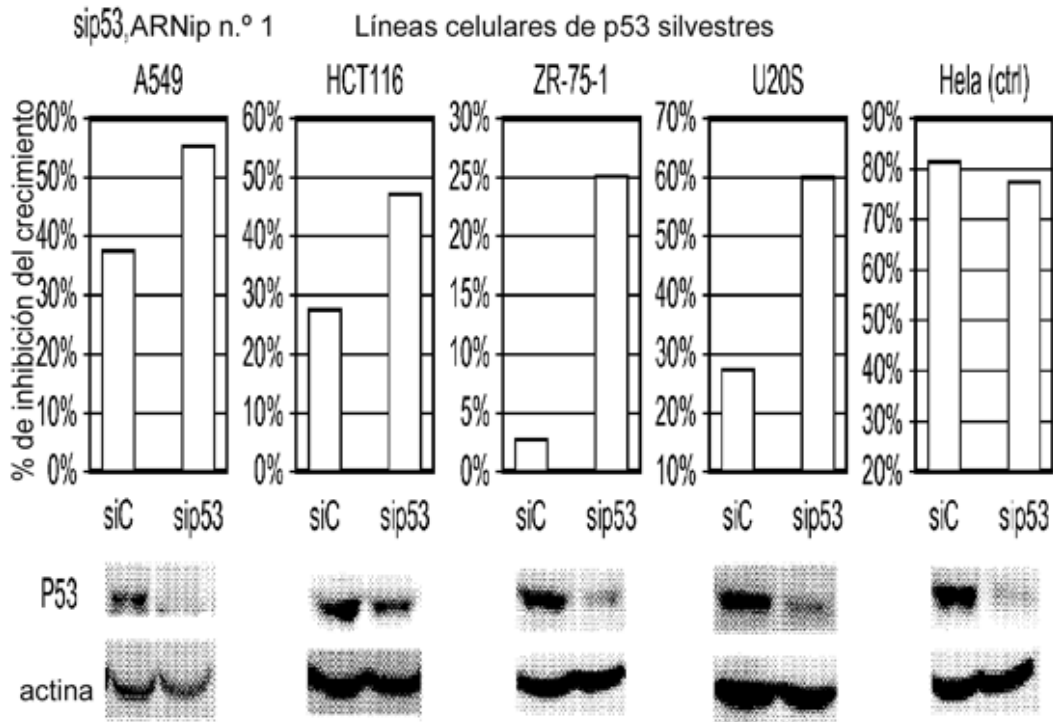
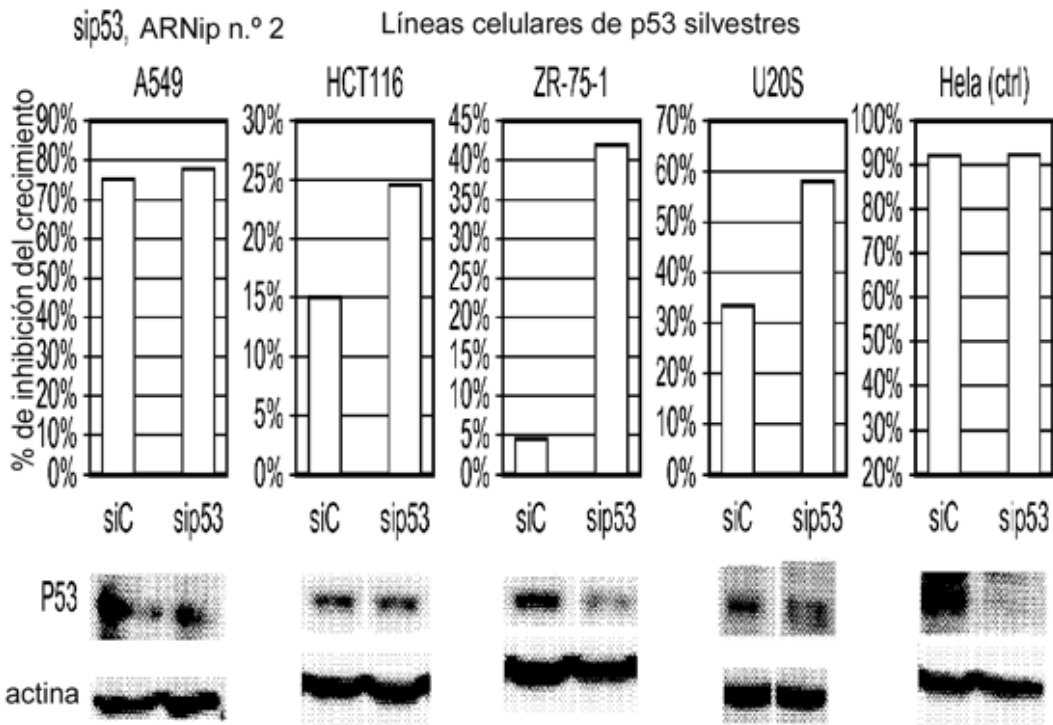


FIG. 4B



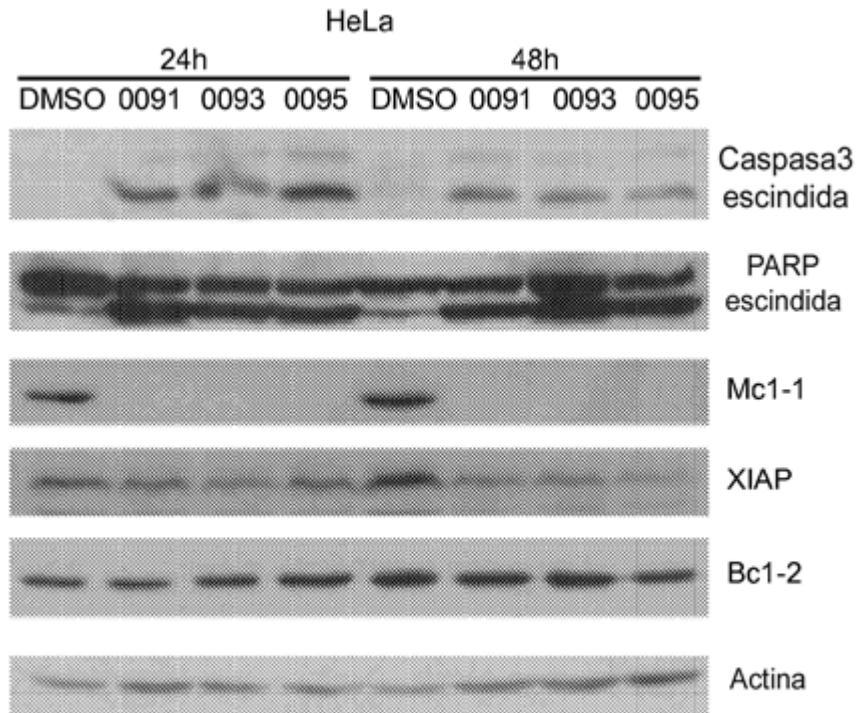
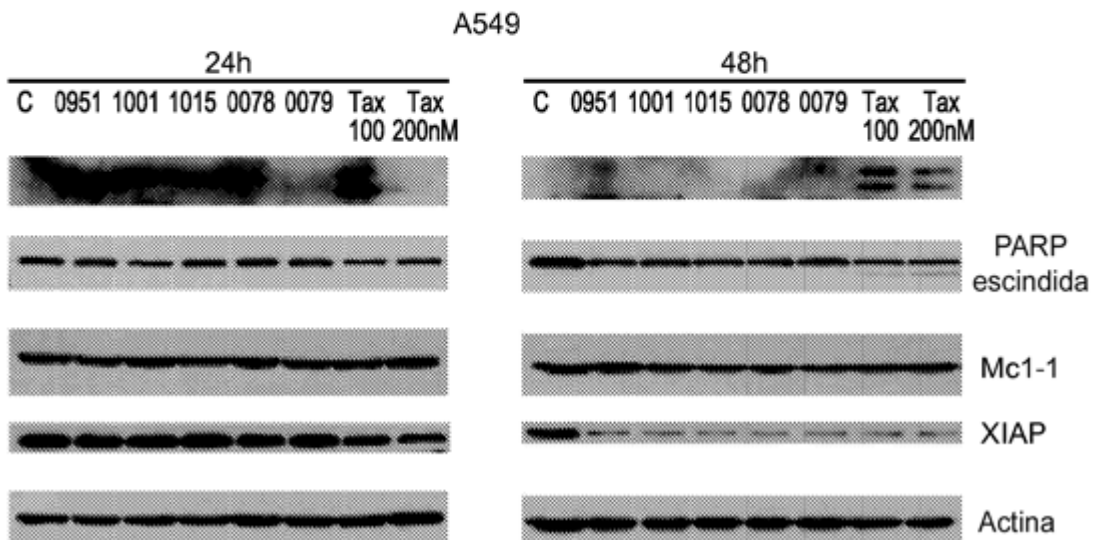


FIG. 5B

FIG. 5C



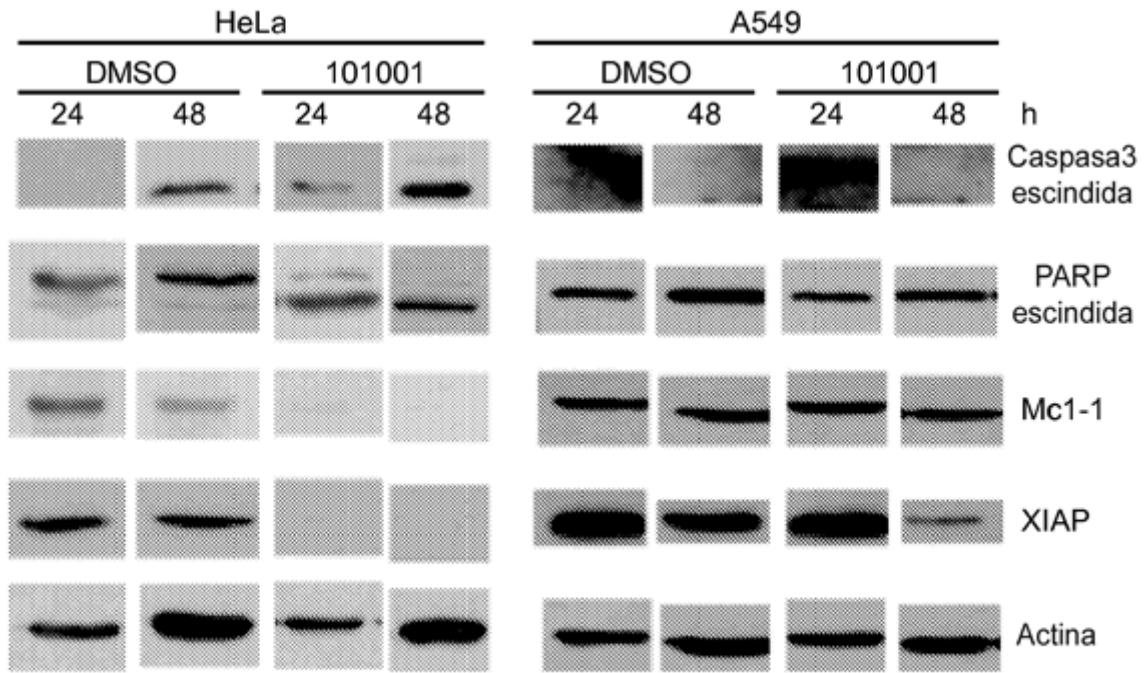


FIG. 5D

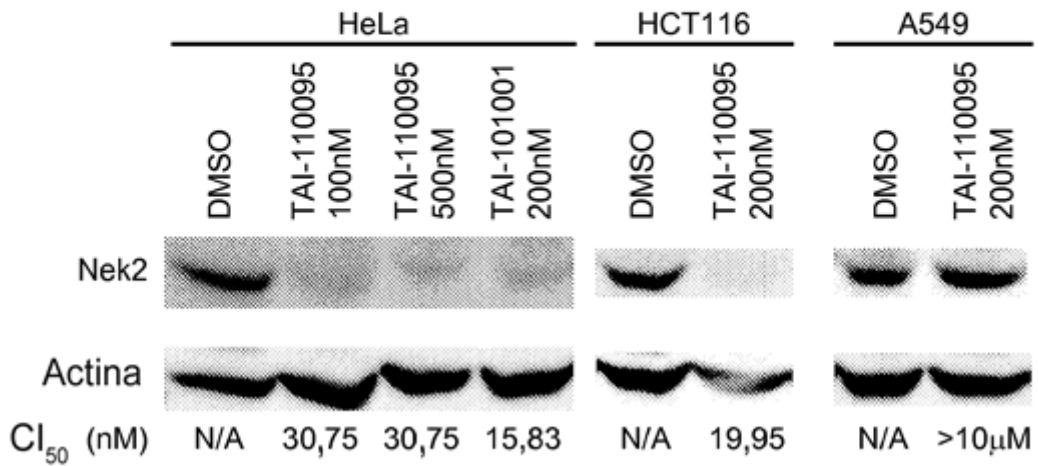


FIG. 6B

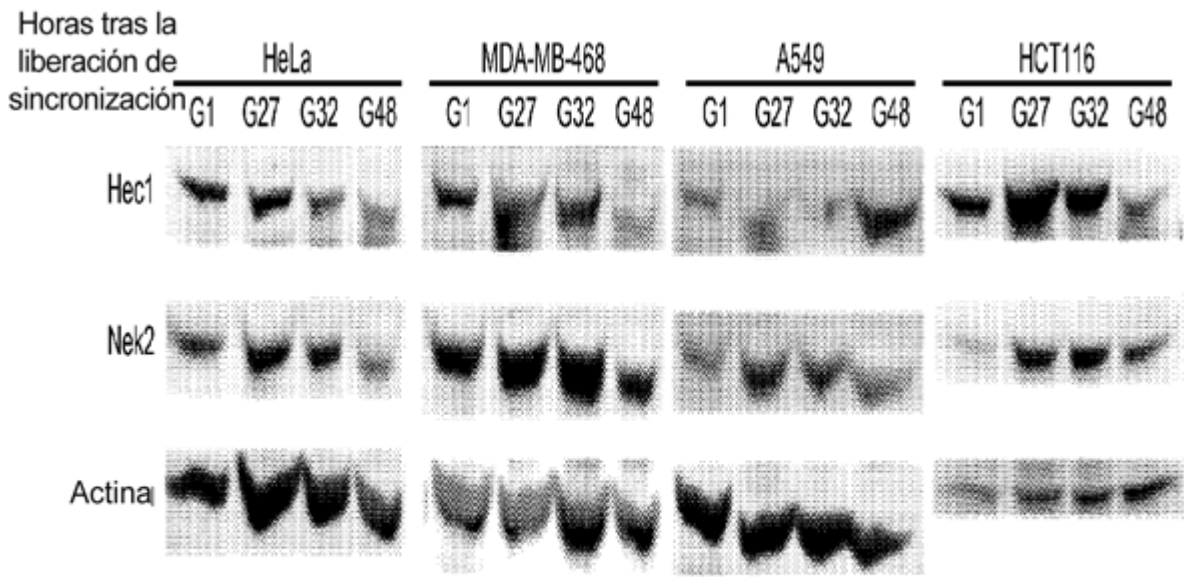


FIG. 6A

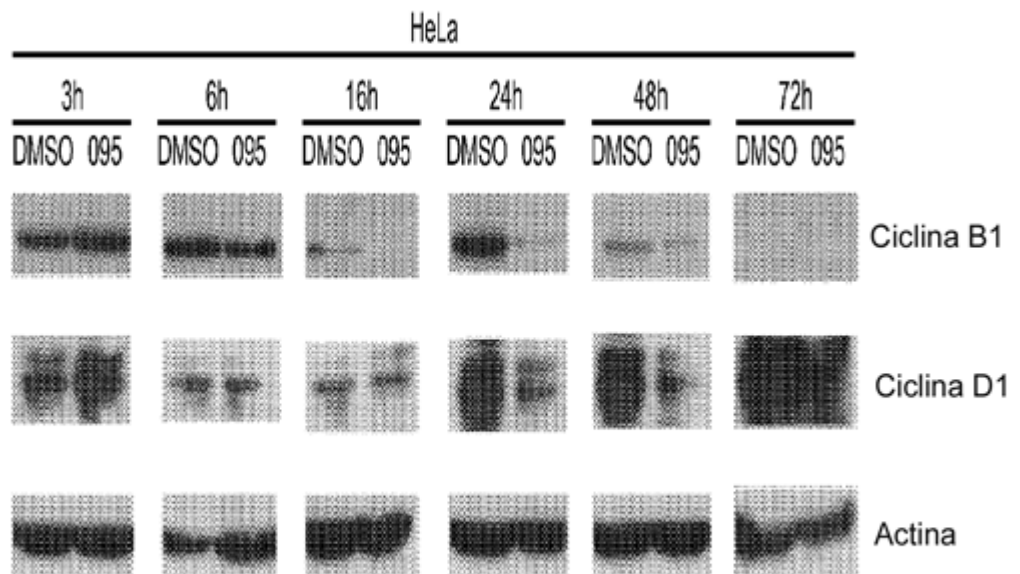


FIG. 6C