(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 968 742**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013 E 20154250 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023 EP 3693476**

(54) Título: **Selección de pacientes con cáncer para la administración de inhibidores de la señalización Wnt utilizando el estado mutacional de Rnf43**

(30) Prioridad:

28.02.2012 US 201261604290 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.05.2024

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

CONG, FENG;
HAO, HUAIXIANG;
HSIEH, HSIN-I;
LIU, JUN;
NG, NICHOLAS y
JIANG, XIAOMO

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

Selección de pacientes con cáncer para la administración de inhibidores de la señalización Wnt utilizando el estado mutacional de Rnf43

Campo de la invención

La invención se refiere en general a identificar pacientes con cáncer que se predice que se beneficiarán de la terapia con el inhibidor de Wnt. La invención también se refiere a un inhibidor de Wnt o a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en un paciente seleccionado específicamente.

Antecedentes de la invención

En Biología y Medicina, la vía canónica Wnt/β-catenina es una serie de eventos de señalización intracelular que implican ligandos Wnt secretados, receptores de la superficie celular y β-catenina coactivadora de la transcripción, así como también muchos otros efectores y reguladores de estos componentes proteicos centrales. En ausencia de ligandos Wnt, la β-catenina es fosforilada constantemente por un complejo multiproteico que desencadena su poliubiquitinación y degradación proteasómica. Tras la unión de la proteína Wnt a sus receptores, la β-catenina citosólica se estabiliza mediante la inhibición del complejo de destrucción y se transloca al núcleo para activar la transcripción de los genes diana de Wnt.

Los receptores principales para las Wnt son la familia de proteínas Frizzled (FZD), con LRP5 o LRP6 (proteínas 5 y 6 relacionadas con el receptor de LDL) como correceptores esenciales para la señalización de Wnt/β-catenina. Nusse R (2005), *Cell Research* 15 (1): 28-32. Los receptores Frizzled son moléculas con siete tramos transmembrana con un dominio largo rico en cisteína. Los correceptores LRP5/6 son proteínas transmembrana de un solo paso. Huang HC y Klein PS (2004) *Genome Biol.* 5 (7): 234. LRP6 es dominante en comparación con LRP5, que solo se requiere para la homeostasis ósea en adultos. McDonald BT *et al.* (2009) *Developmental Cell* 17 (1): 9-26.

La señalización Wnt no canónica es independiente de la β-catenina. Los receptores Frizzled participan en la señalización Wnt no canónica, pero el correceptor LRP6 no es esencial para la actividad de la vía no canónica. Hay al menos dos vías de señalización Wnt no canónicas, la vía de polaridad celular planar (PCP, por sus siglas en inglés) y la vía de liberación de calcio Wnt.

La señalización Wnt/β-catenina es importante para regular el crecimiento celular y la diferenciación durante el desarrollo embrionario. En adultos, la señalización Wnt promueve la homeostasis tisular y su desregulación se ha implicado en varias enfermedades humanas, especialmente el cáncer. Nusse R (2005) *Cell Research* 15 (1): 28-32.

La sobreactivación aberrante de la vía Wnt a menudo es importante para la tumorogénesis de los carcinomas colorrectales. También se ha mostrado que otros tipos de cáncer están asociados con la señalización anómala de Wnt. Estos otros tipos de cáncer incluyen cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de piel. También se ha relacionado una actividad elevada en la vía no canónica Wnt/PCP con la tumorogénesis.

Se han desarrollado antagonistas de la señalización Wnt para tratar tumores dependientes de Wnt. El documento WO2006/017318 divulga métodos para tratar el cáncer usando el anticuerpo anti-Wnt16 que inhibe la señalización WNT16. El documento WO2011/004379 divulga un método para destruir células cancerosas que expresan NCAM y opcionalmente FZD7 que comprende poner en contacto la célula cancerosa con un resto citotóxico y un resto dirigido a NCAM, para destruir así la célula cancerosa. El documento WO2004/032838 divulga un método para inhibir el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan una proteína Wnt, donde el método del documento WO2004/032838 comprende poner en contacto la célula con un agente que inhibe la unión de la proteína Wnt a un receptor Frizzled, donde el agente es un anticuerpo anti-Wnt1 o anti-Wnt2 o anti-Frizzled. Guo *et al.* (Reunión anual de la AACR, 1 de enero de 2007, páginas 1-3) divulga RNF43 como un gen diana de Wnt putativo, lo que indica que RNF43 se sitúa posteriormente en la ruta de señalización Wnt. Se están desarrollando muchos inhibidores de Wnt, como los inhibidores de porcupina, inhibidores de tanquirasa, anticuerpos Frizzled y anticuerpos LRP6, para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, la mayoría de estos inhibidores de Wnt tienen como diana componentes proteicos anteriores de la vía de señalización Wnt. Estos inhibidores de Wnt no inhibirían la señalización Wnt en tumores con mutaciones en genes que sean posteriores en la vía Wnt y, por lo tanto, a menudo no son eficaces contra tumores con mutaciones oncogénicas en los genes de la vía Wnt posteriores tales como APC (poliposis adenomatosa del colon), AXIN1/2 y β-catenina.

Esta falta de tumores identificados por tener mutaciones en genes que son anteriores en la vía Wnt ha obstaculizado el desarrollo clínico de los inhibidores de Wnt. Por lo tanto, en la técnica se necesita un método para identificar una mutación de la vía Wnt asociada al cáncer en un gen o producto génico que sea un componente anterior de la vía Wnt.

Compendio de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de Wnt, que comprende determinar si en una muestra biológica del paciente está presente una mutación inactivadora en el gen RNF43.

En un aspecto, la invención proporciona un inhibidor de Wnt o una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, donde se administra el inhibidor de Wnt al paciente dependiendo de si se detecta una mutación inactivadora en el gen RNF43 en una muestra biológica obtenida del paciente, y donde la presencia de una mutación inactivadora en el gen RNF43 se detecta utilizando un método seleccionado de una lista que consiste en métodos de secuenciación de ADN, secuenciación de ADN genómico, ADNc o ARN de un tejido canceroso, mediante hibridación, reacción en cadena de la polimerasa, análisis en gel de poliacrilamida, cromatografía o espectroscopía, y cribado para detectar un producto proteico alterado codificado por el gen, p. ej., mediante inmunotransferencia, electroinmunotransferencia, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y microscopía inmunofluorescente.

Estos aspectos de la invención y realizaciones adicionales se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG.1 es una fotografía que muestra ensayos de formación de colonias con tratamiento con LGK974. La FIG. 1(a) muestra un ensayo de formación de colonias de células HPAFII en presencia de LGK974 en dos concentraciones (300 nM y 1 µM). Se sembraron 1300 células en medio con el tratamiento indicado y el medio se reemplazó cada 5 días hasta la tinción con cristal violeta en el día 14. LGK974 inhibe la formación de colonias en células HPAFII portadoras de una mutación terminadora en el gen RNF43. La FIG. 1(b) muestra ensayos de formación de colonias de células PK1 (que tienen una proteína RNF43 funcional) y HPAFII (que tienen una proteína RNF43 no funcional) en presencia de LGK974 1 µM solo o junto con la adición diaria de medio acondicionado con un 10% de Wnt3a (MC). Las células PK1 con RNF43 de tipo natural no mostraron sensibilidad a LGK974 durante el ensayo de 10 días. Las células HPAFII con RNF43 mutante fueron inhibidas por LGK974 y la inhibición se rescató parcialmente con la adición de Wnt3a exógeno, de modo que inhibición del crecimiento por LGK974 dependió de la señalización Wnt.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la alineación de la proteína RNF43 y la proteína ZNRF3 para mostrar los residuos conservados. Esta información puede usarse para predecir mutaciones de cambio de sentido que son mutaciones inactivadoras. La secuencia de la proteína RNF43 humana también se proporciona en la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de ZNRF3 humana también se proporciona en la SEQ ID NO: 4.

La FIG. 3 es un conjunto de gráficos de barras que muestran la regulación negativa de la señalización Wnt por RNF43 en células de cáncer pancreático YAPC, que expresan RNF43 de tipo natural. La FIG. 3(a) muestra que el agotamiento de RNF43 aumenta la actividad Super TOPFlash (STF) en la línea de células de cáncer pancreático YAPC. Las células YAPC-STF se transfectaron con el ARNip indicado en ausencia o presencia de medio acondicionado (MC) con Wnt3a, y se midió la actividad del indicador de luciferasa STF. ARNip de pGL2 actúa como un control negativo. La FIG. 3(b) muestra que la activación inducida por ARNip de RNF43 de la actividad STF depende de Wnt endógena. Las células YAPC-STF se transfectaron con el ARNip indicado y a continuación se trataron con DMSO o inhibidor de Porcupina LGK974. A continuación, se midió la actividad del indicador STF. La FIG. 3(c) muestra que el agotamiento de RNF43 aumenta la expresión de AXIN2, un gen diana de β-catenina. Las células YAPC que expresan el vector vacío (VV) o RNF43 resistente a ARNip se transfectaron con el ARNip indicado, y los niveles relativos de ARNm de AXIN2 y RNF43 por RT-PCR cuantitativa.

La FIG. 4 es un conjunto de gráficos de barras que muestran alteraciones en el nivel del ARNm para varios genes relacionados con la señalización Wnt/β-catenina. La FIG. 4(a) muestra que el agotamiento de β-catenina disminuye el nivel de ARNm de AXIN2 y RNF43. Las células se trataron con ARNip, y los niveles relativos de ARNm de los genes indicados se analizaron por RT-PCR cuantitativa. La FIG. 4(b) muestra que los inhibidores de Porcupina disminuyeron la expresión de ARNm de RNF43 y ARNm de AXIN2. Las células YAPC se trataron con IWP2 3 µM o LGK974 1 µM, y se sometieron a análisis de expresión génica por RT-PCR cuantitativa.

Descripción detallada de la invención

Introducción

La información técnica expuesta a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la invención, que está definida por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para situar la presente invención en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados.

Los inventores habían descubierto la función de dos reguladores negativos de la señalización Wnt, proteína dedos de Zinc/RING 3 (ZNRF3, por sus siglas en inglés, Swiss-Prot Q9ULT6, SEQ ID NO: 4) y la proteína con dedos RING 43

(RNF43, por sus siglas en inglés, Swiss-Prot Q68DV7, SEQ ID NO: 3). Hao HX *et al.* (2012) *Nature* 485 (7397): 195-200. RNF43, una proteína con dedos RING asociada al cáncer, es una ubiquitina-ligasa que interactúa con una proteína nuclear, HAP95. Sugiura T *y col.* (2008) *Exp. Cell Res.* 314 (7): 1519-28. ZNRF3 y RNF43 son ambas ubiquitina-ligasas E3 transmembrana de superficie celular homólogas para el receptor de Wnt Frizzled. Ambas proteínas inhiben los niveles de la superficie celular del complejo receptor de Wnt compuesto por Frizzled y LRP6.

Los inventores también habían mostrado que ZNRF3 es inducido transcripcionalmente por la activación de la vía Wnt. La sobreexpresión de ZNRF3 disminuyó la señalización Wnt, mientras que el ARNip de ZNRF3 o el ZNRF3 negativo dominante aumentaron de manera potente la señalización Wnt. La fosforilación de LRP6 se incrementó con la inhibición de ZNRF3, lo que muestra que ZNRF3 actúa anteriormente en la vía Wnt. Por lo tanto, ZNRF3 regula la capacidad de respuesta celular a la estimulación del ligando Wnt. Los inventores confirmaron esta observación en sistemas celulares mediante experimentos *in vivo* utilizando tanto pez cebra como ratones con genes inactivados. Los inventores también han mostrado que RNF43 es un homólogo funcional de ZNRF3 y regula la señalización Wnt.

En la presente, se describe un uso diagnóstico para dos ubiquitina-ligasas E3 transmembrana homólogas (RNF43 y ZNRF3), que regulan de manera negativa los niveles del complejo receptor de Wnt Frizzled/LRP6 mediante la ubiquitinación de Frizzled. En la presente se describe el uso de mutaciones inactivadoras en el gen RNF43 o el gen ZNRF3 como biomarcadores para la selección de células tumorales que son susceptibles de experimentar un retraso de crecimiento debido a inhibidores de la vía Wnt. En un aspecto, la invención proporciona la selección de pacientes con cáncer para el tratamiento con inhibidores de Wnt, donde la selección es mediante el uso de mutaciones inactivadoras en el RNF43 como biomarcadores para la susceptibilidad tumoral al tratamiento con inhibidores de Wnt. En la presente, se describe que mutaciones inactivadoras de RNF43 tales como mutaciones de cambio de sentido y de desplazamiento del marco de lectura están presentes en tumores primarios y líneas celulares de adenocarcinomas ductales pancreáticos (PDAC, por sus siglas en inglés). Dado que el RNF43 endógeno de tipo natural regula la señalización Wnt en las células PDAC y la inhibición del RNF43 endógeno en PDAC aumenta el nivel Frizzled y la señalización Wnt, la invención proporciona la identificación de un componente de la vía Wnt anterior (RNF43) que está mutado en el cáncer.

En la presente, se muestra que las células cancerosas con mutaciones del gen RNF43 son más sensibles a la inhibición de la vía Wnt. La inhibición de RNF43 en las células cancerosas conlleva un aumento de los niveles de la superficie celular de las proteínas Frizzled. En consecuencia, la señalización Wnt mejorada y las células cancerosas con RNF43 mutante, particularmente las células de cáncer pancreático, son más sensibles a los antagonistas de Wnt. Por lo tanto, la invención proporciona que el estado mutacional de RNF43 puede usarse como una estrategia de selección de pacientes con cáncer para la administración terapéutica de inhibidores de la señalización Wnt.

Los inhibidores de Wnt son útiles en composiciones farmacéuticas para uso humano o veterinario donde la inhibición de la vía Wnt está indicada, por ejemplo, en el tratamiento de tumores o crecimiento celular anómalo. La invención proporciona un inhibidor de Wnt o una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para uso en un método de tratamiento de un paciente con cáncer con un inhibidor de Wnt, que comprende administrar un inhibidor de Wnt o una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt a un paciente dependiendo de si se detecta una mutación inactivadora en el gen RNF43 en una muestra biológica obtenida del paciente, donde la presencia de una mutación inactivadora en el gen RNF43 se detecta utilizando un método seleccionado de una lista que consiste en métodos de secuenciación de ADN, secuenciación de ADN genómico, ADNc o ARN de un tejido canceroso, mediante hibridación, reacción en cadena de la polimerasa, análisis en gel de poliacrilamida, cromatografía o espectroscopia, y cribado para detectar un producto proteico alterado codificado por el gen, p. ej., mediante inmunotransferencia, electroinmunotransferencia, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y microscopía inmunofluorescente.

ZNRF3 y RNF43 son homólogos funcionales y ZNRF3 también está mutado en ciertos tipos de tumores. El estado mutacional de ZNRF3 es, por lo tanto, también informativo para la selección de pacientes con cáncer para la administración terapéutica de antagonistas de Wnt.

En la presente, también se describe un ensayo o kit para estudiar el estado mutacional del gen RNF43 o del gen ZNRF3. El ensayo o kit puede ser un ensayo de diagnóstico complementario para su uso después de la aprobación del fármaco de un inhibidor de Wnt relacionado.

RNF43 y tumores pancreáticos

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, por sus siglas en inglés) es la forma más común de cáncer pancreático. PDAC es extremadamente agresivo y se asocia con un pronóstico sombrío. Matthaei H *et al.* (2011) *Ann. Surg. Oncol* 18 (12): 3493-9; Luebke AM *et al.* (2012) *Pancraetology* 12 (1): 16-22; Hezel AF (2006) *Genes Dev.* 20 (10). La endoplasia intraepitelial pancreática (PanIN, por sus siglas en inglés), la neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN, por sus siglas en inglés) y la neoplasia quística mucínica (MCN, por sus siglas en inglés) se consideran precursores de PDAC. A pesar de sus características ductales, PDAC no surge necesariamente del compartimento ductal.

La vía de señalización Wnt/β-catenina se regula dinámicamente durante el desarrollo pancreático y es necesaria para el desarrollo del páncreas exocrino. Wells JM (2007) *BMC Dev. Biol.* 7: 4. La inhibición de la señalización Wnt/β-catenina interrumpe el desarrollo acinar pero no de los islotes del páncreas. La expresión inducible de β-catenina estabilizada en el páncreas de ratones adultos aumenta la proliferación de células exocrinas maduras con efectos mínimos en las células de los islotes. Heiser PW *et al.* (2006) *Development* 133 (10): 2023-32. Cada vez hay más pruebas de que la activación de la vía Wnt puede contribuir al mantenimiento y/o progresión de PDAC. Morris JP *et al.* (2010) *Nat. Rev. Cancer* 10 (10): 683-95. Se observa acumulación nuclear o citoplasmática de β-catenina en un subconjunto de PDAC (Pasca di Magliano M *et al.* (2007) *PLoS One* 2 (11): e1155), lo que indica que la vía está activada. El nivel de β-catenina citosólica y nuclear se correlaciona de manera positiva con el grado PanIN y el desarrollo de PDAC (Wang L *et al.* (2009) *Cancer Sci.* 101 (3): 700-6), de manera que la señalización de β-catenina promueve la progresión de PDAC. El agotamiento de la β-catenina disminuyó la proliferación de las células PDAC, lo que muestra la importancia de la β-catenina en el mantenimiento del fenotipo transformante.

RNF43 está mutado con frecuencia en IMPN y MCN (Furukawa T *et al.* (2011) *Sci. Rep.* 1: 161; Wu J *et al.* (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (52): 21188-93). IPMN y MCN son precursores del adenocarcinoma ductal pancreático invasivo (PDAC).

En la técnica se conoce la secuencia del RNF43 humano. El ADNc de RNF43 humano completo (NM_017763.4) se puede adquirir de proveedores comerciales (por ejemplo, Open Biosystems, Glastonbury, CT, EE. UU. 06033). Para obtener más información sobre RNF43, consulte la Pat. de EE. UU. N.º 7 425 612. El polipéptido TAT179 es idéntico a la región extracelular RNF43 después del péptido señal. Véase la solicitud de patente internacional WO2003/024392, concedida en Europa como EP1487877B1.

Recientemente, se propuso que RNF43 era un supresor tumoral en tumores pancreáticos quísticos. Wu J *et. al.* (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 2188. En un estudio de secuenciación de todo el exoma, 6 de 8 neoplasias mucinosas papilares intraductales (IPMN) y 3 de 8 neoplasias quísticas mucinosas (MCN) mostraron que albergaban mutaciones inactivadoras de RNF43. La preponderancia de mutaciones inactivadoras en RNF43 y la pérdida de heterocigosidad (LOH, por sus siglas en inglés) de su locus establecen a RNF43 como un supresor tumoral tanto en IPMN como en MCN. En su informe, Wu *et al.* no proporcionó ningún estudio funcional de RNF43.

Más recientemente, se mostró que la deleción específica del intestino de Znrf3 y Rnf43 induce la sobreproliferación de las criptas intestinales y la formación de adenoma intestinal en ratones. Koo BK *et al.* (2012) *Nature* 488 (7413): 665-9. Además, se han identificado mutaciones de RNF43 en diferentes tumores, incluidos los tumores pancreáticos quísticos. Estos estudios muestran que RNF43 actúa como un regulador negativo de la señalización Wnt/β-catenina relacionada con ZNRF3.

Sin embargo, no se ha identificado un sistema celular en el que RNF43 sea importante, y el estudio de pérdida de función *in vitro* de RNF43 no ha sido posible. Por lo tanto, la relevancia fisiológica de la mutación RNF43 en el cáncer ha sido desconocida hasta la fecha.

Vía Wnt/β-catenina

La vía de señalización Wnt/β-catenina conservada evolutivamente es importante para el desarrollo embrionario y la homeostasis del tejido adulto. Logan CY y Nusse R (2004) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20: 781-810; Clevers H (2006) *Cell* 127 (3): 469-80. La señalización Wnt regula el recambio del cofactor de la transcripción β-catenina y controla los programas clave de la expresión génica del desarrollo. MacDonald BT *et al.* (2009) *Dev. Cell* 17 (1): 9-26. En ausencia de la activación de la vía Wnt, la β-catenina citosólica se asocia con el complejo de destrucción de β-catenina, que contiene múltiples proteínas, que incluyen poliposis adeomatosa del colon (APC, por sus siglas en inglés), AXIN y la glucógeno sintasa cinasa 3α/β (GSK3α/β). En este complejo, la β-catenina es fosforilada constitutivamente por GSK3, y la β-catenina fosforilada es degradada por la vía de la ubiquitina-proteasoma. La señal Wnt es recibida por sus dos receptores, Frizzled y LRP5/6, lo que conduce a la disociación del complejo de destrucción de β-catenina. La β-catenina estabilizada entra en el núcleo, se une a la familia de factores de transcripción TCF y activa la transcripción.

Se ha implicado la activación aberrante de la señalización Wnt/β-catenina en la tumorogénesis, y muchos componentes posteriores de la vía Wnt están mutados en los cánceres. Se observan mutaciones de truncamiento de APC en un 80% del cáncer colorrectal. También se observan mutaciones de estabilización de β-catenina y las mutaciones de pérdida de función de AXIN1/2 en varios tipos de cáncer. A pesar de la intensa investigación, actuar sobre la señalización de β-catenina en los cánceres que albergan la mutación de la vía posterior sigue constituyendo un desafío debido a la falta de dianas manejables. Por otro lado, hay varias dianas manejables en la vía de señalización Wnt anterior. Se están desarrollando varios agentes dirigidos a la señalización Wnt anterior, incluido el anticuerpo LRP6 (Ettenberg S *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (35): 15473-8), anticuerpo Frizzled (Gurney A *et al.* (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (29): 11717-22), e inhibidor de Porcupina (Chen B *et al.* (2009) *Nat. Chem. Biol.* 5 (2): 100-7). Sin embargo, el desarrollo clínico de estos agentes ha sido difícil previamente, ya que estas moléculas no inhibirían la señalización de β-catenina en tumores con una mutación posterior y ha resultado un desafío identificar tumores humanos adictos a la señalización Wnt/β-catenina inducida por ligando.

Definiciones

«Cáncer", tal como se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 8 093 011 y la Pat. de EE. UU. N.º 8 093 011 es un nombre genérico para una amplia gama de neoplasias malignas celulares caracterizadas por un crecimiento desregulado, falta de diferenciación y la capacidad de invadir tejidos locales y generar metástasis. Estas neoplasias malignas afectan, con diversos grados de prevalencia, a cada tejido y órgano del cuerpo. Por lo tanto, el término «cáncer», tal como se usa en la presente, se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de las células que provocan cáncer, tales como proliferación descontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, rápido crecimiento y tasa de proliferación, y ciertos rasgos morfológicos característicos. A menudo, las células cancerosas adoptarán la forma de un tumor, pero tales células pueden existir solas o pueden circular en el torrente sanguíneo como células independientes, como las células leucémicas.

El «crecimiento celular anómalo» se refiere al crecimiento celular que es independiente de los mecanismos reguladores normales (por ejemplo, pérdida de inhibición por contacto). Esto incluye el crecimiento anómalo de: (1) células tumorales (tumores) que proliferan por la hiperactividad de una vía Wnt en la célula; (2) células benignas y malignas de otras enfermedades proliferativas en las que se produce una hiperactividad aberrante de una vía Wnt en la célula; (4) cualesquiera tumores que proliferen por hiperactividad de una vía Wnt en la célula; (5) cualesquiera tumores que proliferen por hiperactividad de una vía Wnt en la célula; y (6) células benignas y malignas de otras enfermedades proliferativas en las que se produce una hiperactividad aberrante de una vía Wnt.

Un «biomarcador» es cualquier cosa que pueda usarse como un indicador de un estado patológico particular o algún otro estado fisiológico de un organismo, tal como un ser humano. Un biomarcador puede ser la presencia de un gen, un alelo de un gen, una medida de la expresión génica, una proteína o un efecto funcional de la actividad de la proteína que puede medirse y correlacionarse con un estado fisiológico. Los biomarcadores se usan en medicina como parámetros de laboratorio que un médico puede usar como ayuda para tomar decisiones al realizar un diagnóstico y seleccionar un curso de tratamiento.

Una «pérdida de heterocigosidad» (LOH) es una deleción de material genético (ADN) que experimentan casi todas las variedades de cáncer, en comparación con las células normales. Véase, la Pat. de EE. UU. N.º 7 718 364. La pérdida de material genético de las células cancerosas puede dar como resultado la pérdida selectiva de uno de dos o más alelos de un gen en un locus particular en el cromosoma, donde el gen puede afectar al crecimiento celular. Debido a la heterogeneidad genética o al polimorfismo del ADN, muchos de los alelos apareados de genes difieren entre sí. Cuando los dos alelos son idénticos, se dice que el individuo es homocigótico para ese par de alelos en ese locus particular. Como alternativa, cuando los dos alelos son diferentes, el individuo es heterocigótico en ese locus. Típicamente, ambos alelos se transcriben y, en última instancia, se traducen en proteínas idénticas en el caso homocigótico o en proteínas diferentes en el caso heterocigótico. Si se pierde uno de un par de alelos heterocigóticos debido a la deleción de ADN de uno de los cromosomas apareados, solo se expresará el alelo restante y las células afectadas serán homocigóticas desde un punto de vista funcional. Esta situación se denomina "pérdida de heterocigosidad" (LOH) o reducción a la homocigosidad. Mediante el uso de sondas de ADN, el ADN de las células normales de un individuo se puede comparar con el ADN extraído de las células tumorales del mismo individuo y se puede identificar LOH utilizando técnicas experimentales muy conocidas en la técnica. Como alternativa, se puede analizar LOH demostrando dos formas polimórficas de una proteína en células heterocigóticas normales, y solo una forma en células cancerosas donde se ha producido la deleción de un alelo. Véase, por ejemplo, Lasko et *al.* (1991) *Annu. Rev. Genet.* 25: 281-314. Se ha informado de LOH frecuente en regiones cromosómicas específicas en muchos tipos de neoplasias malignas, lo que muestra la existencia de genes supresores de tumores o genes relacionados con tumores putativos en estos loci o cerca de ellos. Por lo tanto, el análisis LOH es una herramienta poderosa para buscar un gen supresor de tumores al estrechar e identificar la región donde existe un gen putativo. Véase, Vogelstein *et al.* (1988) *New Engl. J. Med.* 319 (9): 525-532; Fearon *et al.* (1990) *Cell* 61: 759-767; y Friend *et al., Nature* 323: 643-646 (1986). Los análisis han identificado muchos tipos de genes relacionados con tumores o supresores de tumores candidatos. Véase, Call *et al.* (1990) *Cell* 60: 509-520; Kinzler *et al.* (1991) *Science* 253: 661-665; y Baker *et al.* (1989) *Science* 244: 217-221.

Una mutación de «pérdida de la función» (LOF, por sus siglas en inglés) es una mutación o alelo de un gen, cuyo resultado es que el producto génico (tal como la proteína codificada) tiene una función inferior a la normal o no tiene función en una célula u organismo (incluido una célula humana o un ser humano). Cuando el alelo tiene una pérdida completa de la función (alelo nulo), a menudo se lo llama mutación amorfa. Los fenotipos asociados con mutaciones de pérdida de la función son a menudo recesivos.

Una «sustitución» es una mutación que intercambia una base por otra (es decir, un cambio en una única «letra química», tal como cambiar una A por una G). Una sustitución de este tipo podría (1) cambiar un codón a uno que codifica un aminoácido diferente y causar un pequeño cambio en la proteína producida (por ejemplo, la anemia de células falciformes está causada por una sustitución en el gen de la beta-hemoglobina, que altera un único aminoácido en la proteína producida, (2) cambiar un codón a uno que codifica el mismo aminoácido y no causa ningún cambio en la proteína producida («mutaciones silenciosas»), o (3) cambiar un codón que codifica un aminoácido a un único codón de «parada» y provocar una proteína incompleta (una proteína incompleta por lo general no es funcional).

Una «inserción» es una mutación en la que se insertan pares de bases adicionales en un lugar en el ADN.

Una «deleción» es una mutación en la que una sección de ADN se pierde o se elimina.

Un «desplazamiento del marco de lectura» es una mutación provocada por inserciones o deleciones) de una serie de nucleótidos que no es divisible de forma equitativa por tres de una secuencia de ADN. Debido a la naturaleza triple de la expresión de genes a partir de codones, la inserción o deleción puede cambiar el marco de lectura (el agrupamiento de codones), lo que da como resultado una traducción completamente diferente de la original. Esto a menudo genera proteínas truncadas que dan como resultado una pérdida de la función.

La «secuenciación de Sanger» (llamada así por su inventor Frederick Sanger) es el método de terminación de la cadena para secuenciar polinucleótidos. Una característica del método de secuenciación de Sanger es el uso de didesoxinucleótidotrifosfatos (ddNTP) como terminadores de la cadena de ADN. El método de secuenciación Sanger es a menudo un método automático.

Los métodos de «secuenciación de última generación» son un grupo de métodos de secuenciación de alto rendimiento desarrollados recientemente en el que el proceso de secuenciación se realiza en paralelo y se producen miles o millones de secuencias a la vez. La combinación del aumento de los datos generados, junto con la reducción de los costes necesarios para generar estos datos, ha hecho que esta tecnología sea reconocida por los expertos en la técnica como una herramienta manejable de uso general.

El término «tratar» tal como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir, ya sea parcial o completamente, el crecimiento de tumores, metástasis tumorales u otras células neoplásicas o causantes de cáncer en un paciente . El término «tratamiento» tal como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, se refiere al acto de tratar.

La frase «un método de tratamiento» o su equivalente, cuando se aplica al tratamiento del cáncer, se refiere a un procedimiento o curso de acción diseñado para reducir o eliminar la cantidad de células cancerosas o para aliviar los síntomas de un cáncer. «Un método para tratar» el cáncer u otro trastorno proliferativo no necesariamente significa que las células cancerosas u otras células desordenadas se eliminarán realmente, que el número de células o trastorno se reducirá realmente, o que los síntomas de un cáncer u otro trastorno se aliviarán realmente. A menudo, se llevará a cabo un método para tratar el cáncer incluso con una baja probabilidad de éxito, pero que, dado el historial médico y la esperanza de supervivencia estimada, se considera un curso de acción beneficioso en general.

Un «agente terapéuticamente eficaz» es una composición que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que esté buscando el investigador, veterinario, médico u otro facultativo.

Una «cantidad terapéuticamente eficaz» o «cantidad eficaz» es la cantidad del compuesto o combinación objeto que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está buscando el investigador, veterinario, médico u otro facultativo.

Un «inhibidor» es un compuesto que inhibe (por ejemplo, antagoniza, reduce, disminuye, bloquea, revierte o altera) el efecto de un compuesto de origen natural o de referencia tal como se ha descrito anteriormente. Tales inhibidores pueden incluir cualquier compuesto, proteína, péptido o ácido nucleico (incluidos ribozimas y antisentido) o producto de diseño o selección de fármacos/compuestos/péptidos que proporcione el efecto antagonista.

Un polinucleótido «aislado», o una molécula de ácido nucleico aislada, es una molécula de ácido nucleico que se ha separado de su medio natural (es decir, que ha sido sometida a manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o el cromosoma en el que la molécula de ácido nucleico se encuentra en la naturaleza. Como tal, «aislado» no refleja necesariamente el grado en que la molécula de ácido nucleico se ha purificado, pero muestra que la molécula no incluye un genoma completo o un cromosoma completo en el que la molécula de ácido nucleico se encuentra en la naturaleza. Los polinucleótidos tales como los utilizados en un método de la invención para detectar genes (por ejemplo, por hibridación con un gen) son habitualmente una porción del gen diana que es adecuada para uso como sonda de hibridación o cebador de PCR para la identificación de un gen completo (o una porción de este) en una muestra dada (por ejemplo, una muestra celular). Una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir un gen o una porción de un gen (por ejemplo, la región reguladora o el promotor). Una molécula de ácido nucleico aislada que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye dicho gen, sino que incluye la región codificante y las regiones reguladoras asociadas con el gen, pero no genes adicionales que se encuentran de forma natural en el mismo cromosoma. Una molécula de ácido nucleico aislada también puede incluir una secuencia de ácido nucleico especificada flanqueada por (es decir, en el extremo 5 'o el extremo 3' de la secuencia, o ambos) ácidos nucleicos adicionales que normalmente no flanquean la secuencia de ácido nucleico especificada en la naturaleza (es decir, secuencias heterólogas). La molécula de ácido nucleico aislada puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm) o derivados de ADN o ARN (por ejemplo, ADNc). Aunque la frase «molécula de ácido nucleico» se refiere principalmente a la molécula física de ácido nucleico y la frase «secuencia de ácido nucleico» se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos frases se pueden usar indistintamente, especialmente con respecto a un molécula de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico, que es capaz de codificar una proteína. Se puede producir una molécula de ácido

nucleico aislada usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química.

Una «sonda» (sonda oligonucleotídica) es una molécula de ácido nucleico en la que su tamaño normalmente varía de aproximadamente 50-100 nucleótidos a varios cientos de nucleótidos a varios miles de nucleótidos de longitud. Por lo tanto, una sonda puede tener cualquier longitud adecuada para su uso en un ensayo descrito en la presente, incluida cualquier longitud en el intervalo de 50 a varios miles de nucleótidos, en incrementos de números enteros. Dicha molécula se usa normalmente para identificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra mediante la hibridación con dicha secuencia de ácido nucleico diana en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de hibridación son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al* . (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Labs Press.

Los «cebadores» también son secuencias de ácido nucleico. Los cebadores de PCR son normalmente oligonucleótidos de longitud bastante corta (por ejemplo, 8-30 nucleótidos) que se usan en reacciones en cadena de la polimerasa. Los expertos en la técnica pueden desarrollar y producir fácilmente cebadores y sondas de hibridación de PCR, utilizando información de la secuencia procedente de la secuencia diana. Véase, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Labs Press.

Los términos «muestra de prueba» o «muestra del paciente» se pueden usar generalmente para referirse a una muestra de cualquier tipo que contenga células o productos que hayan sido secretados de las células para ser evaluados por el método de la invención, que incluyen, sin carácter limitante, una muestra de células aisladas, una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal. Una muestra de células aisladas es una muestra de células, normalmente en suspensión o separadas del tejido conectivo que pueda haber conectado las células dentro de un tejido *in vivo* , que se han recogido de un órgano, tejido o fluido mediante cualquier método adecuado que dé como resultado la recogida de un número adecuado de células para su evaluación por el método de la invención. Las células en la muestra de células no son necesariamente del mismo tipo, aunque se pueden utilizar métodos de purificación para enriquecer en el tipo de células que se evalúan preferentemente. Las células pueden obtenerse, por ejemplo, raspando un tejido, procesando una muestra de tejido para liberar células individuales o mediante aislamiento a partir de un fluido corporal.

Una «muestra de tejido», aunque similar a una muestra de células aisladas, se define en la presente como una sección de un órgano o tejido del cuerpo que normalmente incluye varios tipos de células, opcionalmente con estructuras del citoesqueleto que mantienen las células juntas. El término «muestra de tejido» puede usarse, en algunos casos, indistintamente con una «muestra de células», aunque el término «muestra de tejido» puede usarse más frecuentemente para designar una estructura más compleja que una muestra de células. Se puede obtener una muestra de tejido mediante una biopsia, por ejemplo, que incluye corte, corte en rebanadas o sacabocados.

Una «muestra de fluido corporal», como la muestra de tejido, contiene las células que se van a evaluar, y es un fluido obtenido por cualquier método adecuado para el fluido corporal particular que se va a muestrear. Los fluidos corporales adecuados para el muestreo incluyen, sin carácter limitante, sangre, mucosa, líquido seminal, saliva, esputo, lavado bronquial, leche materna, bilis y orina.

Un «nivel de control» es un nivel de control de la heterocigosidad, que puede incluir un nivel que se correlaciona con la sensibilidad al inhibidor de Wnt o un nivel que se correlaciona con la resistencia al inhibidor de Wnt. Por lo tanto, se puede determinar, en comparación con el control o el nivel de referencia de pérdida de la heterocigosidad, si una muestra de un paciente es más probable que sea sensible o resistente a la terapia con inhibidores de Wnt (por ejemplo, que responde bien o que responde (uno que se beneficiará de la terapia) o que responde mal o no responde (uno que no se beneficiará o se beneficiará poco de la terapia). Más específicamente, un «nivel de control» puede denotar un nivel de control de la heterocigosidad; una secuencia de ADN, ADNc o ARN que muestra un estado natural, normal o de referencia; un nivel de control del ARNm o actividad de RNF43; un nivel de control del ARNm o actividad de ZNRF3, el efecto funcional de la pérdida del gen RNF43 o la pérdida del gen ZNRF3, que puede incluir un nivel, secuencia o efecto que se correlaciona con la sensibilidad al inhibidor de Wnt o un nivel que se correlaciona con la resistencia al inhibidor de Wnt. Por lo tanto, se puede determinar, en comparación con la heterocigosidad de control; una secuencia de ADN, ADNc o ARN que muestra un estado natural, normal o de referencia; ARNm o actividad normal o de referencia de RNF43; ARNm o actividad normal o de referencia de ZNRF3, o efecto funcional normal o de referencia de los genes RNF43 o ZNRF3, si una muestra de un paciente, una célula cancerosa o una célula es más probable que sea sensible o resistente al inhibidor de Wnt. El «nivel de control» puede referirse a la secuencia, parámetro o nivel medido para la comparación en un tejido o célula no cancerosa, sana, de tipo natural, o en una realización particular, una célula tumoral tratada con placebo.

La expresión «individuos emparejados» se refiere a un emparejamiento de los individuos de control en función de una o más características que son adecuadas para el tipo de crecimiento tumoral o celular que se va a evaluar. Los individuos de control se pueden emparejar con el paciente que se va a evaluar en función del género, edad, raza o cualquier factor biológico o sociológico relevante que pueda afectar a la referencia de los individuos de control y el paciente (por ejemplo, afecciones preexistentes, consumo de sustancias concretas, niveles de otros factores biológicos o fisiológicos).

Una «composición farmacéutica» es una combinación de agente activo y otro portador, por ejemplo, compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o etiqueta detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservantes, adyuvantes o similares. Los portadores también incluyen excipientes y aditivos farmacéuticos, por ejemplo: proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluidos monosacáridos y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes solos o combinados, que comprenden solos o combinados un 1-99,99% en peso o volumen. Los excipientes de carbohidratos incluyen, por ejemplo: monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol. Puede ser un sólido o estar en forma líquida.

Métodos

En un aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de Wnt, que comprende determinar si en una muestra biológica del paciente está presente una mutación inactivadora en el gen RNF43.

En una realización, la presencia de la mutación inactivadora se detecta mediante métodos de secuenciación de ADN. En una realización, la presencia de la mutación inactivadora se detecta secuenciando el ADN genómico, ADNc o ARN de un tejido canceroso. En una realización, la presencia de la mutación inactivadora se detecta mediante hibridación, reacción en cadena de la polimerasa, análisis en gel de poliacrilamida, cromatografía o espectroscopía. En una realización, la mutación inactivadora se detecta mediante un cribado para detectar un producto proteico alterado codificado por el gen, p. ej., mediante inmunotransferencia, electroinmunotransferencia, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y microscopía inmunofluorescente.

De acuerdo con la divulgación, el estado mutacional del gen RNF43 o del gen ZNRF3 en las células tumorales se puede analizar mediante cualquiera de los siguientes métodos, o mediante una combinación de los métodos.

(i) Análisis del número de copias del ADN de la región RNF43 en el cromosoma 17 en el locus genómico 17q22 para ver si se pierden una o ambas copias del gen RNF43. Como alternativa, análisis del número de copias del ADN de la región ZNRF3 en el cromosoma 22 en el locus genómico 22q12.1 para ver si se pierden una o ambas copias del gen ZNRF3. La pérdida de heterocigosidad de RNF43 o ZNRF3 es un biomarcador para tumores que se seleccionan para reducir su tasa de crecimiento mediante el tratamiento con un inhibidor de Wnt.

(ii) Secuenciación de ADN genómico, ADNc o ARN a partir de tejidos cancerosos para detectar una mutación inactivadora en el gen RNF43. Una mutación inactivadora de RNF43 o ZNRF3 es un biomarcador para tumores que se seleccionan para reducir su tasa de crecimiento mediante el tratamiento con un inhibidor de Wnt. Una mutación inactivadora puede ser una mutación terminadora, una mutación de desplazamiento del marco de lectura, una variante de corte y empalme o una mutación de cambio de sentido que produce un cambio de aminoácidos en los residuos conservados.

(iii) Ensayo de expresión del ARNm de RNF43 o ensayo de expresión del ARNm de ZNRF3 usando Taqman u otras técnicas similares. Las mutaciones terminadoras o de desplazamiento del marco de lectura en los ARNm a menudo dan como resultado una desintegración de ARNm mediada por la mutación terminadora. Por lo tanto, la pérdida de la expresión del ARNm de RNF43 en células cancerosas podría usarse como un ensayo secundario o alternativo para detectar mutaciones terminadoras o de desplazamiento del marco de lectura de RNF43. La ausencia de ARNm de RNF43 también podría deberse al silenciamiento epigenético, en cuyo caso no hay mutación en el ADN genómico.

(iv) Analizar el efecto funcional de la pérdida del gen RNF43 o la pérdida del gen ZNRF3, tal como mediante el análisis y la detección de un aumento de los niveles de proteína Frizzled, aumento de los niveles de la proteína LRP6, aumento de la fosforilación de LRP6 y aumento de la fosforilación de Disheveled en muestras tumorales en comparación con el control normal (donde el aumento de los niveles de la proteína Frizzled, aumento de los niveles de proteína LRP6, aumento de la fosforilación de LRP6 y el aumento de la fosforilación de Disheveled en muestras tumorales es indicativo de un nivel inferior al del control del biomarcador gen RNF43 o del biomarcador gen ZNRF3).

El paso de detección se puede realizar mediante el uso de una sonda de nucleótidos que se hibrida con las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO: 1 (para RNF43) o la SEQ ID NO: 2 (para ZNRF3).

Una mutación inactivadora puede ser una mutación terminadora (véase la TABLA 1 y la TABLA 2), una mutación de desplazamiento del marco de lectura (véase la TABLA 1 y TABLA 2), una mutación del sitio de corte y empalme o una mutación de cambio de sentido que da como resultado un cambio de aminoácidos en los residuos conservados. La FIG.

2 muestra una alineación de las proteínas RNF43 y ZNRF3 humanas, que proporciona una guía sobre cuáles son los aminoácidos conservados en las proteínas.

Una mutación en el sitio de corte y empalme es una mutación genética que inserta o elimina una serie de nucleótidos en el sitio específico en el que se produce el corte y empalme de un intrón durante el procesamiento del ARN mensajero precursor en ARN mensajero maduro. La supresión del sitio de corte y empalme da como resultado que uno o más intrones permanezcan en el ARNm maduro y puede dar lugar a la producción de proteínas aberrantes.

Las mutaciones terminadoras o de desplazamiento del marco de lectura en los ARNm a menudo dan como resultado una desintegración de ARNm mediada por la mutación terminadora. Por lo tanto, la pérdida de la expresión del ARNm de RNF43 en células cancerosas podría usarse como un ensayo secundario o alternativo para detectar mutaciones terminadoras o de desplazamiento del marco de lectura de RNF43. La ausencia de ARNm de RNF43 también podría deberse al silenciamiento epigenético, en cuyo caso no hay mutación en el ADN genómico.

El paso de comparación se puede llevar a cabo comparando el nivel de biomarcador en las células tumorales con un nivel de control del biomarcador en una o más células de control que son resistentes al inhibidor de Wnt o en una o más células de control que son sensibles al inhibidor de Wnt, o ambos. En un aspecto, se ha predeterminado el nivel de control del biomarcador que se ha correlacionado con la sensibilidad o resistencia al inhibidor de Wnt.

Para el paso de selección del paciente que se predice que se beneficiará o no se beneficiará de la terapia con el inhibidor de Wnt, se contempla que para la mayoría de los pacientes estudiados, la mayoría de los pacientes tendrán tumores resistentes al tratamiento con inhibidores de Wnt. Se espera que la dependencia de los tumores de la señalización Wnt no sea tan frecuente como la dependencia de los tumores de la señalización del factor de crecimiento. Además, si los tumores dependientes de Wnt tienen mutaciones genéticas posteriormente en la vía Wnt, entonces los tumores no responderían a la mayoría de los inhibidores de Wnt actuales. Por lo tanto, en la técnica es necesario seleccionar para el tratamiento el conjunto de pacientes con cáncer que responderán bien al tratamiento con inhibidor de Wnt. La capacidad de predecir a los que responderán bien es la principal utilidad de la determinación del estado mutacional de RNF43 o el estado mutacional de ZNRF3 en tumores de pacientes con cáncer.

Se puede utilizar cualquiera de las realizaciones del método de la invención descrito anteriormente con un paciente que tiene cualquier tipo de cáncer. En una realización, el paciente tiene un carcinoma ductal, adenocarcinoma o melanoma (véase la TABLA 1). En otra realización, el paciente tiene un cáncer pancreático, un cáncer de colon, un cáncer de esófago o un cáncer de piel (véase la TABLA 1, TABLA 2, TABLA 3, TABLA 4 y TABLA 5). En otro método más de la invención, el paciente tiene un tumor gástrico con una mutación de RNF43.

En cualquiera de las realizaciones de la invención descritas anteriormente, se puede evaluar la sensibilidad a cualquier inhibidor de Wnt. *In vitro*, la sensibilidad del inhibidor de Wnt puede determinarse en ensayos estándar de proliferación, diferenciación y apoptosis celular. El efecto del inhibidor de Wnt sobre el estado de la señalización Wnt en las células tumorales se puede evaluar verificando el nivel de β-catenina, la expresión de ARNm del gen diana de β-catenina AXIN2 y la fosforilación de LRP6. En la clínica, la evaluación se basa en cuánto se reduce el tumor según la obtención de imágenes si es un tumor sólido o un biomarcador para el estado del tumor, por ejemplo, mediante una tomografía por emisión de positrones (PET).

En la técnica existe constancia de métodos para medir el volumen tumoral. Véase, Therasse P. *et al.* (2000) *J. Natl. Cancer Inst.* 92(3): 205-216. Se deberían utilizar el mismo método de evaluación y la misma técnica para caracterizar cada lesión identificada y señalada en el inicio y durante el seguimiento. Se prefiere la evaluación basada en imágenes a la evaluación por examen clínico cuando se han utilizado ambos métodos para evaluar el efecto antitumoral de un tratamiento.

Examen clínico. Las lesiones detectadas clínicamente solo se considerarán medibles cuando sean superficiales (por ejemplo, nódulos de la piel y ganglios linfáticos palpables). Para el caso de las lesiones cutáneas, se recomienda la documentación mediante fotografías en color, incluida una regla para estimar el tamaño de la lesión.

Radiografía de pecho. Las lesiones en la radiografía de tórax son aceptables como lesiones medibles cuando están claramente definidas y rodeadas de pulmón aireado. Sin embargo, se prefiere la TAC. Se proporcionan más detalles sobre el uso de este método de evaluación para la evaluación objetiva de la respuesta tumoral en Therasse P *et al.* (2000) *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (3): 205-216.

TAC e IRM. La tomografía computarizada de rayos X (TAC) y la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) son los mejores métodos y más reproducibles de los que se dispone en la actualidad para medir las lesiones diana seleccionadas para la evaluación de la respuesta. La TAC y la IRM convencionales se deben realizar con cortes contiguos de 10 mm o menos de grosor de corte. La TAC espiral debe realizarse mediante el uso de un algoritmo de reconstrucción contigua de 5 mm; esta memoria descriptiva se aplica a los tumores de pecho, abdomen y pelvis, mientras que los tumores de cabeza y cuello y los de las extremidades generalmente requieren protocolos específicos. Véase, Therasse P *et al.* (2000) *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (3): 205-216.

Ecografía. Cuando el criterio de valoración primario del estudio es la evaluación objetiva de la respuesta, la ecografía no debe usarse para medir lesiones tumorales que no son fácilmente accesibles desde el punto de vista clínico. Puede usarse como una posible alternativa a las medidas clínicas para los ganglios linfáticos palpables superficiales, lesiones subcutáneas y nódulos tiroideos. La ecografía también puede ser útil para confirmar la desaparición completa de las lesiones superficiales, generalmente evaluadas mediante examen clínico. Las justificaciones para no utilizar la ecografía para medir las lesiones tumorales para la evaluación objetiva de la respuesta se proporcionan en el Apéndice I.

Endoscopia y laparoscopia. La utilización de estas técnicas para la evaluación objetiva del tumor aún no se ha validado total o ampliamente. Sus usos en este contexto específico requieren equipos sofisticados y un alto nivel de experiencia que puede estar disponible solo en algunos centros. Por lo tanto, la utilización de tales técnicas para la respuesta objetiva del tumor debe limitarse a fines de validación en centros especializados. Sin embargo, tales técnicas pueden ser útiles para confirmar la respuesta histopatológica completa cuando se obtienen muestras de biopsia.

Marcadores tumorales. Los marcadores tumorales que se usan para la correlación con las medidas del volumen tumoral (es decir, no los marcadores de la invención) solos no pueden usarse para evaluar la respuesta. Sin embargo, si los marcadores están inicialmente por encima del límite superior normal, deben volver a los niveles normales para que se considere que un paciente tiene una respuesta clínica completa cuando todas las lesiones tumorales hayan desaparecido. Se están validando criterios adicionales específicos para el uso estandarizado de antígeno prostático específico y respuesta de CA (antígeno de cáncer) 125 en apoyo de ensayos clínicos.

Citología e histología. Las técnicas citológicas e histológicas se pueden usar para diferenciar entre la respuesta parcial y la respuesta completa en casos raros (por ejemplo, después del tratamiento para diferenciar entre las lesiones benignas residuales y las lesiones malignas residuales en tipos de tumores como los tumores de células germinales). Se requiere confirmación citológica de la naturaleza neoplásica de cualquier derrame que aparezca o empeore durante el tratamiento cuando el tumor medible haya cumplido los criterios de respuesta o enfermedad estable. En tales circunstancias, el examen citológico del líquido recolectado permitirá la diferenciación entre la respuesta o la enfermedad estable (un derrame puede ser un efecto secundario del tratamiento) y la enfermedad progresiva (si se confirma el origen neoplásico del líquido). Las nuevas técnicas para establecer mejor la respuesta objetiva del tumor se integrarán en estos criterios cuando estén completamente validadas para usarse en el contexto de la evaluación de la respuesta tumoral.

Pérdida de la heterocigosidad.

El método para establecer un nivel de control de pérdida de la heterocigosidad se selecciona en función del tipo de muestra, el tejido u órgano del que se obtiene la muestra y el estado del paciente que se va a evaluar. El método puede ser el mismo método que se utilizará para evaluar la muestra en el paciente. El nivel de control se puede establecer usando el mismo tipo de célula que la célula que se va a evaluar. El nivel de control se puede establecer a partir de muestras de control que son de pacientes o líneas celulares que se sabe que son resistentes o sensibles a los inhibidores de Wnt. En una ocasión, las muestras de control se obtuvieron de una población de individuos emparejados.

Para establecer un nivel de control, se obtienen y evalúan muestras de una serie de individuos emparejados de la misma manera que para las muestras de prueba. Los expertos en la materia pueden determinar el número de individuos emparejados de los que se deben obtener muestras de control para establecer un nivel de control adecuado (por ejemplo, una población), pero deben ser estadísticamente apropiados para establecer una referencia adecuada para la comparación con el paciente que se va a evaluar (es decir, el paciente de prueba). Los valores obtenidos de las muestras de control se procesan estadísticamente utilizando cualquier método adecuado de análisis estadístico para establecer un nivel de referencia adecuado utilizando métodos estándar en la técnica para establecer dichos valores.

El número de copias del gen RNF43 o el gen ZNRF3 por célula tumoral se puede detectar mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH). FISH es una técnica basada en ADN que se puede realizar con éxito en muestras tumorales frescas o conservadas mediante inclusión en parafina. La tecnología está bien establecida y se pueden generar fácilmente sondas con un tiempo de obtención reducido en laboratorios de patología molecular y citogenética clínica. Se comercializan sondas FISH para RNF43 de ratón, de modo que un experto en la técnica sería capaz de generar fácilmente la correspondiente sonda FISH para RNF43 humano. Véase, Rogan P *et al.* (2001) *Genome Res.* 11(6): 1086-1094. Como alternativa, se ofrencen servicios comerciales de diseño personalizado de una sonda FISH para un gen humano, tal como RNF43 humano o ZNRF3 humano, tal como Sondas FISH de Empire Genomics, Búfalo, NY, EE. UU.

Hibridación

La detección de un gen se puede lograr mediante ensayos de hibridación. La hibridación de ácidos nucleicos simplemente implica poner en contacto una sonda (por ejemplo, un oligonucleótido o un polinucleótido mayor) y ácido nucleico diana en condiciones en las que la sonda y su diana complementaria pueden formar dúplex híbridos estables a través del emparejamiento de bases complementarias. Según se usa en el presente documento, las condiciones de hibridación se refieren a condiciones de hibridación estándar en las que se usan moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas de ácido nucleico similares. Dichas condiciones estándar se divulgan, por ejemplo, en Sambrook *et*

al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Labs Press (incorporado por referencia en su totalidad, véanse específicamente las páginas 9.31-9.62). Además, se divulgan fórmulas para calcular las condiciones de hibridación y lavado apropiadas para lograr la hibridación que permiten diversos grados de falta de emparejamiento de nucleótidos, por ejemplo, en Meinkoth *et al.* (1984) *Anal. Biochem.* 138, 267-284. Los ácidos nucleicos que no forman dúplex híbridos se eliminan con lavados de los ácidos nucleicos hibridados y a continuación, los ácidos nucleicos hibridados se pueden detectar, típicamente mediante la detección de una etiqueta detectable unida. Los ácidos nucleicos se desnaturalizan aumentando la temperatura o disminuyendo la concentración salina del tampón que contiene los ácidos nucleicos. En condiciones de rigurosidad baja (por ejemplo, temperatura baja o mucha sal o ambas) se formarán dúplex híbridos (por ejemplo, ADN:ADN, ARN:ARN o ARN:ADN) incluso cuando las secuencias hibridadas no sean perfectamente complementarias. Por lo tanto, la especificidad de la hibridación se reduce con una rigurosidad menor. Por el contrario, en una rigurosidad más alta (por ejemplo, temperatura más alta o menos sal) el éxito de la hibridación requiere menos emparejamientos erróneos.

Las condiciones de hibridación y lavado de rigurosidad alta, como se denominan en la presente, se refieren a condiciones que permiten el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que tienen al menos aproximadamente un 90% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico que se usa como sonda en la reacción de hibridación (es decir, condiciones que permiten aproximadamente un 10% o menos de emparejamientos erróneos de nucleótidos). Un experto en la materia puede usar las fórmulas de Meinkoth *et al.* (1984) *Anal. Biochem.* 138, 267-284 para calcular las condiciones de hibridación y lavado apropiadas para lograr estos niveles particulares de emparejamiento erróneo de nucleótidos. Tales condiciones variarán, dependiendo de si se están formando híbridos de ADN:ARN o ADN:ADN. Como alternativa, la T_m puede calcularse empíricamente como se establece en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Labs Press., páginas 9.31 a 9.62.

Los ácidos nucleicos hibridados se detectan detectando una o más etiquetas unidas a los ácidos nucleicos de la muestra. Las etiquetas pueden incorporarse mediante uno cualquiera de varios medios muy conocidos por los expertos en la técnica. Las etiquetas detectables adecuadas para su uso en la invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las etiquetas útiles en la invención incluyen tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, Alexa Fluor, tintes Spectrum y similares), puntos cuánticos, radioetiquetas (por ejemplo, ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C o ^{32}P), y etiquetas colorimétricas. Los medios para detectar tales etiquetas son muy bien conocidos por los expertos en la técnica. Así pues, por ejemplo, las radioetiquetas pueden detectarse usando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar luz emitida y microscopios de fluorescencia. Las etiquetas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada. Preferentemente, los ácidos nucleicos de hibridación se detectan mediante etiquetas fluorescentes y de la manera más preferente, en el contexto de un ensayo de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés). Los ensayos de FISH son bien conocidos en la técnica.

Mutación inactivadora

En la presente, se describe que los tumores que tienen una mutación inactivadora en el gen RNF43 o el gen ZNRF3 es más probable que respondan a (es decir, a que su crecimiento se vea ralentizado por) un inhibidor de Wnt. La detección de una o más mutaciones en el gen RNF43 o el gen ZNRF3 es predictiva de que el paciente se beneficiará del tratamiento con el inhibidor de Wnt. En los EJEMPLOS se proporciona una guía para la detección de una o más mutaciones en el gen RNF43.

La detección de una o más mutaciones en el gen gen RNF43 es predictiva de que es más probable que un paciente responda o se beneficie de la terapia con inhibidores de Wnt. La detección de ausencia de mutaciones es predictiva de que es poco probable que un paciente responda o se beneficie de la terapia con inhibidores de Wnt. Los métodos para el cribado de mutaciones genéticas son muy conocidos en la técnica y se describen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Labs Press, e incluyen hibridación, reacción en cadena de la polimerasa, análisis en gel de poliacrilamida, cromatografía o espectroscopía. Con los avances recientes en la «secuenciación de última generación», se contempla que la secuenciación directa de polinucleótidos se convierta en el método fiable menos costoso para analizar el estado mutacional del gen RNF43 o el estado mutacional del gen ZNRF3.

Los métodos de cribado para detectar mutaciones génicas pueden incluir además el cribado para detectar un producto proteico alterado codificado por el gen (por ejemplo, mediante inmunotransferencia (por ejemplo, inmunoelectrotransferencia), ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y microscopía de inmunofluorescencia.

Para la pérdida de ARNm de RNF43, se puede considerar que una caída de al menos un 50% en el ARNm indica una pérdida de la función, debido a que las muestras tumorales no están compuestas de manera homogénea por células tumorales.

Muestra del paciente

Un experto en la técnica estará familiarizado con los métodos adecuados para obtener una muestra del paciente. Una muestra del paciente puede incluir cualquier fluido o tejido corporal de un paciente que pueda contener células tumorales o proteínas de células tumorales.

En general, el tipo de muestra (es decir, células, tejidos o fluidos corporales) se selecciona en función de la accesibilidad y la estructura del órgano o tejido que se va a evaluar para determinar el crecimiento de células tumorales o sobre qué tipo de cáncer se va a evaluar. La invención es particularmente útil para evaluar un tumor tal como un carcinoma ductal, adenocarcinoma o melanoma (véase la TABLA 1) o tumores de pacientes con cáncer pancreático, un cáncer de colon, un cáncer de esófago o un cáncer de piel (véase la TABLA 1, TABLA 2, TABLA 3, TABLA 4 y TABLA 5). En estos casos, una muestra típica es una sección de una muestra tumoral o de una muestra de tejido pancreático del paciente, respectivamente.

Una vez que se obtiene una muestra del paciente, se evalúa la muestra para detectar uno o más de cualquiera de los biomarcadores descritos en la presente. En algunas realizaciones de la invención, un tejido, una célula o una porción de estos (por ejemplo, una sección de tejido, un componente de una célula tal como ácidos nucleicos, etc.) se pone en contacto con uno o más ácidos nucleicos. Tales protocolos se usan para detectar la expresión génica o la pérdida de la heterocigosidad, por ejemplo. Tales métodos pueden incluir ensayos que utilizan células o ensayos que no utilizan células. El tejido o la célula que expresa un gen diana generalmente se pone en contacto con un agente de detección (por ejemplo, una sonda, cebador u otro marcador detectable), mediante cualquier método adecuado, tal como mediante la mezcla, hibridación o combinación de una manera que permita la detección del gen diana mediante una técnica adecuada.

La muestra del paciente se prepara por cualquier método adecuado para la técnica de detección utilizada. En una realización, la muestra del paciente se puede usar fresca, congelada, fijada o conservada de otro modo. Por ejemplo, las células tumorales del paciente se pueden preparar inmovilizando el tejido del paciente en parafina. El tejido inmovilizado se puede seccionar y a continuación, poner en contacto con una sonda para detectar la hibridación de la sonda con un gen diana (por ejemplo, el gen RNF43 o el gen ZNRF3).

Controles

No es necesario establecer un nivel de control para cada ensayo según se realiza el ensayo. Más bien, se puede establecer una referencia o control haciendo referencia a una forma de información almacenada referente a un nivel de control determinado previamente para pacientes sensibles y resistentes (que responden y que no responden). Se puede establecer un nivel de control para cualquiera de los métodos de detección descritos anteriormente, para su uso cuando se utilice un método de detección correspondiente. Tal forma de información almacenada puede incluir un cuadro de referencia, una lista o un archivo electrónico de datos de poblaciones o individuos respecto a tumores/pacientes sensibles y resistentes, o cualquier otra fuente de datos respecto a la pérdida génica de heterocigosidad del nivel de control que sea útil para el paciente que se va a evaluar.

Un nivel de control para la comparación puede ser cualquier tipo de control, incluido un control preestablecido que se proporciona como una forma de información. Se pueden idear otros sistemas de puntuación basados en comparaciones con controles, y los pacientes que estén cerca del valor de corte se pueden evaluar mediante otros criterios, biomarcadores o técnicas para confirmar un diagnóstico. Además, el valor de corte se puede variar según lo desee el médico o investigador según las poblaciones de pacientes.

Para un control que se ha correlacionado con resistencia a los inhibidores de Wnt, cuando el biomarcador es una mutación inactivadora en el gen RNF43 o el gen ZNRF3, el control puede ser la secuencia de tipo natural del gen RNF43 o el gen ZNRF3 . Dichas secuencias son de acceso público y están bien definidas. En una realización, se proporciona la secuencia del gen RNF43 en la SEQ ID NO: 1. En otra realización, se proporciona la secuencia del gen ZNRF3 mediante la SEQ ID NO: 2.

Para la pérdida de ARNm de RNF43, se debe observar al menos una disminución de un 50% de la expresión de ARNm en las muestras tumorales.

Otro control para la resistencia a los inhibidores de Wnt serían las muestras no tumorales del mismo paciente. Si tales muestras no tumorales no están disponibles, entonces se pueden comparar los valores promedio de otros pacientes o sujetos sanos, porque la mayoría de los pacientes no responderían a los inhibidores de Wnt.

Inhibidores de Wnt

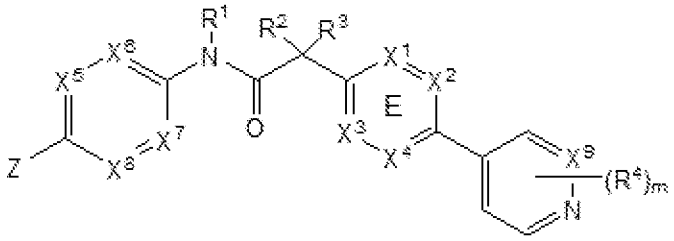
El método de la invención es útil para determinar o predecir los pacientes que es más probable que respondan (por ejemplo, con un beneficio terapéutico) a la terapia que usa un inhibidor de Wnt o un fármaco que tiene una actividad biológica sustancialmente similar al inhibidor de Wnt, así como también para determinar o predecir los pacientes que es más probable que no respondan a la terapia usando un inhibidor de Wnt. La divulgación también proporciona que las

células cancerosas con mutaciones del gen RNF43 son más sensibles a la inhibición de la vía Wnt. La inhibición de RNF43 en células cancerosas conduce a un aumento de los niveles de Frizzled en la superficie celular. En consecuencia, las células con una señalización Wnt mejorada y cancerosas, particularmente las células de cáncer de páncreas, con RNF43 mutante son más sensibles a un antagonista de Wnt. Véanse las FIGS. 3 y 4, relativas a HPAFII, una línea celular con una proteína RNF43 no funcional. Los inventores también han observado que la línea celular Panc10.05, que también tiene una proteína RNF43 no funcional, también es sensible a los inhibidores de Porcupina.

En una realización, el inhibidor de Wnt es un inhibidor de Porcupina adecuado para uso en seres humanos. El inhibidor de Wnt puede ser un inhibidor de Porcupina que tiene una función similar a un inhibidor de Porcupina conocido tal como IWP-2, IWP-3 o IWP-4, que se describen en Chen B *et al.* (2009) *Nature Chem. Biol.* 5: 100-107 y comercializados por Miltenyi Biotech como Inhibidor de Wnt Stemolecule™ IWP-2 (n.º 130-095-584), inhibidor de Wnt Stemolecule™ IWP-3 (n.º 130-095-585) e inhibidor de Wnt Stemolecule™ IWP-4) Stemolecule™ IWP-2, Stemolecule™ IWP-3 y Stemolecule™ IWP-4 previenen la palmitilación de proteínas Wnt por Porcupina (PORCN), una O-aciltransferasa unida a la membrana.

Como alternativa, los inhibidores de Wnt pueden ser productos del diseño de fármacos y se pueden producir usando diversos métodos conocidos en la técnica. Véase, la solicitud de patente internacional WO2010/101849, publicada el 10 de septiembre de 2010. Varios métodos de diseño de fármacos, útiles para diseñar miméticos u otros compuestos útiles en la invención se divulgan en Maulik *et al.* (1997) *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*. Wiley-Liss, Inc. Se puede obtener un inhibidor de Wnt a partir de estrategias de diversidad molecular (una combinación de estrategias relacionadas que permite la construcción rápida de grandes colecciones de moléculas con diversidad química), colecciones de compuestos naturales o sintéticos, en particular de colecciones químicas o combinatorias (es decir, colecciones de compuestos que difieren en secuencia o tamaño pero que tienen similares componentes básicos) o por diseño de fármacos racional, dirigido o aleatorio. Véase, por ejemplo, Maulik *et al.* (1997) *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*. Wiley-Liss, Inc. En una estrategia de diversidad molecular, se sintetizan grandes colecciones de compuestos, por ejemplo, a partir de péptidos, oligonucleótidos, compuestos esteroides naturales o sintéticos, carbohidratos o moléculas orgánicas y no esteroides naturales o sintéticas, utilizando enfoques biológicos, enzimáticos o químicos. Los parámetros críticos en el desarrollo de una estrategia de diversidad molecular incluyen diversidad de subunidades, tamaño molecular y diversidad de colecciones. El objetivo general de cribar dichas colecciones es utilizar la aplicación secuencial de selección combinatoria para obtener ligandos de alta afinidad para una diana deseada, y después optimizar las moléculas iniciales mediante estrategias de diseño aleatorias o dirigidas. Los métodos de diversidad molecular se describen en detalle en Maulik *et al.* (1997) *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*. Wiley-Liss, Inc.

En una realización preferida, el inhibidor de Wnt es un compuesto de Fórmula (1):



(1)

o una sal fisiológicamente aceptable de este, donde:

X^1, X^2, X^3 y X^4 se seleccionan entre N y CR^7;

uno de X^5, X^6, X^7 y X^8 es N y los otros son CH;

X^9 se selecciona entre N y CH;

Z se selecciona entre fenilo, pirazinilo, piridinilo, piridazinilo y piperazinilo; donde cada fenilo, pirazinilo, piridinilo, piridazinilo o piperazinilo de Z está sustituido opcionalmente con un grupo R^6;

R^1, R^2 y R^3 son hidrógeno;

m es 1;

R^4 se selecciona entre hidrógeno, halo, difluorometilo, trifluorometilo y metilo;

R^6 se selecciona entre hidrógeno, halo y $-C(O)R^{10}$; donde R^{10} es metilo; y

R^7 se selecciona entre hidrógeno, halo, ciano, metilo y trifluorometilo.

El inhibidor de Wnt puede ser un compuesto seleccionado del grupo de:

N-[5-(3-fluorofenil)piridin-2-il]-2-[5-metil-6-(piridazin-4-il)piridin-3-il]acetamida;

2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-*N*-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida (LGK974);

N-(2,3'-bipiridin-6'-il)-2-(2',3-dimetil-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida;

N-(5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-2-(2'-metil-3-(trifluorometil)-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida;

N-(5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-2-(2'-fluoro-3-metil-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida; y

2-(2'-fluoro-3-metil-2,4'-bipiridin-5-il)-*N*-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

De la manera más preferente, el inhibidor de Wnt es 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-*N*-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida (LGK974).

Un fármaco que tiene una actividad biológica sustancialmente similar a un inhibidor de Wnt se refiere a un fármaco que tiene sustancialmente las mismas funciones exhibidas o realizadas por el compuesto de referencia que se atribuye al compuesto de referencia según se mide u observa *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, un fármaco que tiene una actividad biológica sustancialmente similar a un inhibidor de Porcupina se refiere a un fármaco que tiene sustancialmente las mismas funciones exhibidas o realizadas por un compuesto de referencia como IWP-2, IWP-3 o IWP-4.

En otra realización, el inhibidor de Wnt es el inhibidor de tanquirasa XAV939 (C9289), que se puede adquirir de Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE. UU., y otros proveedores comerciales. Véase, Huang SM *et al.* (2009) *Nature* 461 (7264): 614-20.

Otros tipos de inhibidores de Wnt pueden incluir, sin carácter limitante, aptámeros, iARN y ribozimas. Los aptámeros son hebras cortas de ácidos nucleicos sintéticos (generalmente ARN pero también ADN) seleccionados de colecciones de ácidos nucleicos combinatorias aleatorias en virtud de su capacidad para unirse a una molécula diana específica predeterminada con una alta afinidad y especificidad. Los aptámeros asumen una estructura tridimensional definida y son capaces de discriminar entre compuestos con diferencias muy pequeñas en la estructura. La interferencia por ARN (iARN) es un proceso mediante el cual el ARN bicatenario, y en los sistemas de mamíferos, el ARN interferente pequeño (ARNip), se usa para inhibir o silenciar la expresión de genes complementarios. Una ribozima es un segmento de ARN que es capaz de realizar catálisis biológica (por ejemplo, al romper o formar enlaces covalentes). Más específicamente, las ribozimas son moléculas de ARN antisentido que funcionan uniéndose al resto de ARN diana y lo inactivan escindiendo el esqueleto del fosfodiéster en un sitio de corte específico.

Los otros tipos de inhibidores pueden tener similitud con los inhibidores naturales de Wnt. Los antagonistas naturales conocidos de la señalización Wnt incluyen proteínas Dickkopf, proteínas secretadas relacionadas con Frizzled (sFRP, por sus siglas en inglés), Factor inhibidor de Wnt 1 (WIF-1, por sus siglas en inglés) y Soggy. Los miembros de la familia de proteínas relacionadas con Dickkopf (Dkk-1 a 4) son proteínas secretadas con dos dominios ricos en cisteína, separados por una región conectora. La familia Dkk también incluye Soggy, que es homóloga a Dkk-3 pero no a los otros miembros de la familia.

Las sFRP son una familia de cinco glucoproteínas de unión a Wnt que se asemejan a las Frizzleds unidas a la membrana. La familia más grande de inhibidores de Wnt contiene dos grupos, el primero consiste en sFRP-1, 2 y 5, y el segundo incluye sFRP-3 y 4.

En una realización, el antagonista de la señalización Wnt puede ser un receptor de Wnt soluble, tal como un Frizzled8CRD-hFc, del que se ha publicado que ha inhibido el crecimiento de teratocarcinomas *in vivo*. DeAlmeida VI *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67(11): 5371-9.

Otros antagonistas naturales de la señalización Wnt incluyen WIF-1 (Factor Inhibidor de Wnt 1), una proteína secretada que se une a las proteínas Wnt e inhibe su actividad.

Otro tipo más de inhibidor de Wnt puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de este, o un péptido de unión al antígeno o «compañero de unión». Los anticuerpos se caracterizan por que comprenden dominios de inmunoglobulina y, como tales, son miembros de la superfamilia de proteínas de la inmunoglobulina. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos divalentes y monovalentes, anticuerpos bi- o multiespecíficos, suero que contiene dichos anticuerpos, anticuerpos que se han purificado en diversos grados y

cualesquiera equivalentes funcionales de anticuerpos completos. Los anticuerpos aislados útiles como inhibidores de Wnt pueden incluir suero que contiene dichos anticuerpos, o anticuerpos que se han purificado en diversos grados. Los anticuerpos completos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales. Como alternativa, también se pueden emplear como inhibidores de Wnt equivalentes funcionales de anticuerpos completos, tales como fragmentos de unión al antígeno en los que uno o más dominios del anticuerpos están truncados o ausentes (por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' o $F(ab)_2$), así como también anticuerpos modificados genéticamente o fragmentos de unión al antígeno de estos, incluidos anticuerpos monocatenarios o anticuerpos que se pueden unir a más de un epítopo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), o anticuerpos que se pueden unir a uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, anticuerpos bi- o multiespecíficos).

Se están desarrollando varios anticuerpos que tienen como diana la señalización Wnt anterior, incluido el anticuerpo LRP6 (Ettenberg S *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(35): 15473-8) y el anticuerpo Frizzled (Gurney A *et al.* (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(29): 11717-22).

Ensayos y kits

Los métodos y kits de ensayo de la divulgación se pueden usar para identificar pacientes, células o tejidos que se predice que son sensibles a un inhibidor de Wnt particular. El uso de un kit de diagnóstico complementario de este tipo sería similar a otras pruebas de diagnóstico complementarias aprobadas por las agencias gubernamentales de registro de fármacos para su uso con fármacos aprobados. Véanse, por ejemplo, las autorizaciones de la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) en 2011 de crizotinib para el tratamiento del cáncer de pulmón con ALK4 mutado y de vemurafenib para el melanoma con BRAF mutado.

Los métodos y kits de ensayo de la divulgación también pueden ser útiles para identificar tratamientos que pueden mejorar la sensibilidad de las células cancerosas que son resistentes a los inhibidores de Wnt, y para desarrollar tratamientos adyuvantes que mejoren la respuesta de los inhibidores de Wnt.

Los métodos y kits de ensayo de la divulgación son útiles para pacientes con cualquier cáncer que se pueda tratar con inhibidores de Wnt, tal como el cáncer pancreático (véase la TABLA 2), o cualesquiera tumores cuyo crecimiento se pueda ralentizar con inhibidores de Wnt, tales como los carcinomas ductales, adenocarcinomas o melanomas (véase la TABLA 1). Dichos pacientes pueden, como resultado de los métodos proporcionados en la presente, evitar los efectos secundarios y los costes financieros de una terapia ineficaz en el caso de que no tengan una expresión génica reducida de RNF43 o ZNRF3. Los métodos y kits de ensayo de la divulgación también son útiles para los médicos, que pueden recomendar una terapia con inhibidores de Wnt, o no, para pacientes particulares en función de la información sobre las características moleculares de sus tumores. Los métodos y kits de ensayo de la divulgación también aumentarán de manera útil la demanda para el desarrollo de un ensayo FISH para RNF43 humano eficiente que estará disponible con sondas nucleotídicas aún por desarrollar.

El kit puede incluir un medio para detectar una mutación en el gen RNF43 o el gen ZNRF3.

En una ocasión, el medio para detectar la mutación es una sonda nucleotídica que se hibrida con una porción del gen RNF43 o el gen ZNRF3. En una ocasión, el medio de detección es una sonda de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Cualquiera de los medios de detección puede contener una etiqueta detectable. Cualquiera de los medios de detección puede ser inmovilizado en un sustrato.

En una ocasión, un medio para detectar la pérdida de heterocigosidad del gen RNF43 o el gen ZNRF3 puede ser generalmente cualquier tipo de reactivo que se pueda usar en un método de la divulgación. Tales medios de detección incluyen una sonda o cebador que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el gen RNF43 o ZNRF3. Las secuencias de ácido nucleico para el gen RNF43 o ZNRF3 son conocidas en la técnica y se pueden usar para producir tales reactivos de detección. También se pueden incluir reactivos adicionales útiles para realizar un ensayo utilizando tales medios de detección, tales como reactivos para realizar hibridación *in situ*, reactivos para detectar marcadores fluorescentes, reactivos para realizar una reacción en cadena de la polimerasa, etc.

Los medios de detección del kit de ensayo de la divulgación se pueden conjugar con una marca detectable o etiqueta detectable. Tal etiqueta puede ser cualquier etiqueta adecuada que permita la detección de los reactivos utilizados para detectar el gen o la proteína de interés e incluye, sin carácter limitante, cualquier composición o etiqueta detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las etiquetas útiles en la divulgación incluyen: biotina para la tinción con un conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo de texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radioetiquetas (por ejemplo, 3H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras utilizadas comúnmente en un ELISA) y etiquetas colorimétricas tales como perlas de oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

Además, los medios de detección del kit de ensayo de la divulgación se pueden inmovilizar en un sustrato. Tal sustrato puede incluir cualquier sustrato adecuado para la inmovilización de un reactivo de detección tal como se usaría en cualquiera de los métodos de detección descritos anteriormente. Resumiendo, un sustrato adecuado para la

inmovilización de un medio de detección incluye cualquier soporte sólido, tal como cualquier soporte sólido orgánico, biopolimérico o inorgánico que pueda formar un enlace con los medios de detección sin afectar significativamente la actividad o capacidad de los medios de detección para detectar la molécula diana deseada. Los soportes sólidos orgánicos ejemplares incluyen polímeros tales como poliestireno, nailon, resinas de fenolformaldehído y copolímeros acrílicos (por ejemplo, poliacrilamida). El kit también puede incluir reactivos adecuados para la detección del reactivo o para el etiquetado de controles positivos o negativos, soluciones de lavado, tampones de dilución y similares. El kit también puede incluir un conjunto de instrucciones escritas para usar el kit e interpretar los resultados.

El kit de ensayo también puede incluir uno o más controles. Los controles podrían incluir: (i) una muestra de control para detectar la sensibilidad al inhibidor de Wnt que se está evaluando para su uso en un paciente; (ii) una muestra de control para detectar resistencia al inhibidor de Wnt; (iii) información que contiene un nivel de control predeterminado de un biomarcador particular que se va a medir con respecto a la sensibilidad o resistencia al inhibidor de Wnt (por ejemplo, un nivel de control predeterminado de la pérdida de heterocigosidad del gen RNF43 o del gen ZNRF3 que se ha correlacionado con la sensibilidad al inhibidor de Wnt o resistencia al inhibidor de Wnt).

El kit también puede incluir un medio para detectar un marcador de control que es característico del tipo de célula que se está muestreando, generalmente puede ser cualquier tipo de reactivo que se pueda usar en un método para detectar la presencia de un marcador conocido (a nivel del ácido nucleico o proteína) en una muestra, tal como por un método para detectar la presencia de un biomarcador descrito anteriormente en la presente. Específicamente, el medio se caracteriza por que identifica un marcador específico del tipo de célula que se analiza que identifica positivamente el tipo de célula. Por ejemplo, en un ensayo de tumor pulmonar, es deseable cribar células epiteliales pulmonares para determinar el nivel de expresión o actividad biológica del biomarcador. Por lo tanto, el medio para detectar un marcador de control identifica un marcador que es característico de una célula epitelial y preferentemente, una célula epitelial pulmonar, de modo que la célula se distinga de otros tipos de células, como un tejido conectivo o una célula inflamatoria. Tal medio aumenta la precisión y especificidad del ensayo de la divulgación. Tal medio para detectar un marcador de control incluye, sin carácter limitante: una sonda que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una molécula de ácido nucleico que codifica un marcador proteico; cebadores de PCR que amplifican tal molécula de ácido nucleico; un aptámero que se une específicamente a un sitio distinto desde un punto de vista conformacional en la molécula diana; o un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno de este, o péptido de unión al antígeno que se une selectivamente al marcador de control en la muestra. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos para muchos marcadores celulares son conocidas en la técnica y se pueden usar para producir tales reactivos de detección.

Ejemplos

Ejemplo 1

Como se muestra en la TABLA 1, el gen RNF43 está mutado en el adenocarcinoma ductal pancreático primario y en otros tumores. Mutaciones terminadoras y de desplazamiento del marco de lectura en nueve ADN genómicos de tumores primarios de páncreas, intestino grueso, esófago y piel. De ellos, cinco son tumores pancreáticos y el número total de tumores pancreáticos examinados es 19 (mutados en más de un 25% de las muestras, excluidas mutaciones de cambio de sentido potencialmente dañinas).

TABLA 1

MUTACIÓN	CAMBIO DE AA	ID	PATOLOGÍA	SITIO PRIMARIO	HISTOLOGÍA (SUBTIPO)	EDAD
terminadora	p.R337X	X-1633	primaria	páncreas	carcinoma (carcinoma ductal)	44
desplazamiento del marco de lectura	desconocido	X-1948	primaria	páncreas	carcinoma (carcinoma ductal)	NA
desplazamiento del marco de lectura	desconocido	X-2406	primaria	páncreas	carcinoma (carcinoma ductal)	NA
desplazamiento del marco de lectura	desconocido	X-3184	primaria	páncreas	carcinoma (carcinoma ductal)	55
desplazamiento del marco de lectura	desconocido	X-3268	primaria	páncreas	carcinoma (carcinoma ductal)	78
desplazamiento del marco de lectura	desconocido	X-2239	primaria	intestino grueso	carcinoma (carcinoma ductal)	76
desplazamiento del marco de lectura	desconocido	X-3205	primaria	intestino grueso	carcinoma (adenocarcinoma)	78
desplazamiento del marco de lectura	desconocido	X-1433	metástasis	esófago	carcinoma (adenocarcinoma)	78
terminadora	p.W302X	X-2163	metástasis	piel	melanoma (NS)	54

Ejemplo 2

Tal como se muestra en la TABLA 2, el gen RNF43 está mutado en múltiples líneas celulares de cáncer pancreático. Variaciones genómicas identificadas por la secuenciación de Sanger en 10 líneas celulares de cáncer pancreático potencialmente con solo una copia del gen RNF43 en función del análisis del número de copias. Se identificaron tres líneas celulares únicas con mutaciones inactivadoras de RNF43: HPAFII (mutación terminadora), Panc 10.05 (mutación con desplazamiento del marco de lectura, se relaciona con células PL45), PaTu-8988S (mutación perjudicial, se relaciona con células PaTu-8988T).

TABLA 2

LÍNEA CELULAR	NOMBRE DEL GEN	CAMBIO DE ADNc	EXÓN	CAMBIO DE AA	Conservación	Comentarios
PK-1.	RNF43	*c.g350a*	2	p.R117H	No	
HPAFII	RNF43	*c.g520t*	4	p.E174X	Sí	No funcional

Panc 10.05	RNF43	*c.54insatca*	1	p.M18fs	~	No funcional
PL45	RNF43	*c.54insatca*	1	p.M18fs	~	No funcional
PaTu-8988S	RNF43	*c.t206g*	1	p.F69C	Sí	No funcional
PaTu-8988T	RNF43	*c.t206g*	1	p.F69C	Sí	No funcional
KLM-1		*c.g350a*	2	p.R117H		
Capan-1	RNF43 !	*c.c692t*	6	p.P231L	No	Tanto no polar como hidrófoba
KP1N	RNF43	*c.c692t*	6	p.P231L		Tanto no polar como hidrófoba
PANC-1	RNF43	*c.c692t*	6	p.P231L	No	Tanto no polar como hidrófoba

Se proporciona información adicional sobre las líneas celulares HPAFII, Panc 10.05, PaTu-8988S, así como otras líneas celulares con mutaciones inactivadoras de RNF43 (por ejemplo, Capan-2) en el Ejemplo 3 y el Ejemplo 4 a continuación.

Ejemplo 3

Inhibición de la vía Wnt canónica por LGK974

Se estudió la sensibilidad de las células pancreáticas al tratamiento con LGK974 en un ensayo de proliferación celular *in vitro*. Se trataron veinticuatro líneas celulares humanas de cáncer pancreático con o sin LGK974.

Los datos de proliferación celular se generaron en un formato de 384 pocillos. Las células se recolectaron y se resuspendieron en su medio de crecimiento apropiado en una densidad de 1,5 x 10^4 células por mL. A continuación, las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 384 pocillos (Greiner-BioOne 789163) en un volumen final de 50 µL por pocillo para lograr una densidad por pocillo de 750 células por pocillo utilizando un dispensador BioTek µFill (número de serie 000-3586). A continuación, las placas se transfirieron a incubadoras en el sistema ACP-1 (37° C, 5% de CO_2) y se permitió que las células se adhirieran durante toda la noche. Se preparó una curva de respuesta a la dosis de 12 puntos para LGK974 en una placa fuente compatible ECHO de 384 pocillos (Labcyte P-05525) con una concentración más alta de 2 mM y una concentración más baja de 1,13 x 10^{-5} mM. Aproximadamente 18 horas después de la siembra en placas, se añadió a las células una dosis de 50 nL de LGK974 usando Labcyte ECHO555, con réplicas de las curvas CI_{50} dentro de una placa y réplicas de las placas por línea celular. Después de la adición del compuesto, las placas se devolvieron a la incubadora durante 120 horas. Las placas de ensayo se leyeron con la adición de 10 µL de 1x Cell Titer Glo (Promega G7573) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante diez minutos y se leyeron en un Viewlux integrado de Perkin Elmer (exposición de 2 segundos, 2x *bin*, sensibilidad elevada). Los datos no tratados se normalizaron utilizando los pocillos de control con DMSO dentro de cada placa y se realizó el ajuste de la curva para la determinación de CI_{50} .

El crecimiento celular se midió cinco días después con Cell Titer Glo (Promega). Como se muestra en la TABLA 3, LGK974 inhibió el crecimiento celular con IC_{50} nM en un subconjunto de líneas celulares de cáncer pancreático, incluidas Capan-2, PA-TU-8988S y HPAFII. Como se muestra en la TABLA 4 y el Ejemplo 4, las cuatro líneas celulares albergan mutaciones de pérdida de la función (LOF) en RNF43.

TABLA 3		
Línea celular	CI50 de LGK974 en el ensayo de proliferación de la línea celular	Factor de cambio de la inhibición (1-Tratado/Control)
Capan-2	0,0018	0,40
PA-TU-8988S	0,0116	0,40
HPAFII	0,0336	0,50
TCC-PAN2	>1,7	0,02
BXPC3	>2,0	0,01
HUP-T3	>2,0	0,07
KP-1N	>2,0	0,01
KP-1NL	>2,0	0,00
KP-2	>2,0	0,06
KP-3	>2,0	0,02
Panc 03.27	>2,0	0,06
Panc 05.04	>2,0	0,09
Panc 10.05	>2,0	0,02
Panel	>2,0	0,00
PA-TU-8902	>2,0	0,02
PA-TU-8988T	>2,0	0,00
PK-1	>2,0	0,00
PK-59	>2,0	0,06
PSN-1	>2,0	0,06
SU8686	>2,0	0,03
SUIT-2	>2,0	0,00
SW1990	>2,0	0,03
YAPC	>2,0	0,20

La TABLA 4 muestra una lista de líneas celulares pancreáticas, las mutaciones de RNF43 en las líneas celulares y la inhibición de la vía por LGK974.

TABLA 4			
ID de la muestra (Línea celular)	Mutación LOF potencial	Proliferación CI_{50}	Inhibición de la vía
Capan-2	p.R330fs	0,0018	Sí
HPAFII	p.E174X	0,0336	Sí
PA-Tu-8988S	F69C	0,0116	Sí
PA-TU-8988T	F69C	>2,0	Sí
Panc 10.05	p.M18fs	>2,0	Sí
PL45	p.M18fs	NA	No
BXPC3	p.S495Y	>2,0	Sí
KP1N	Ninguna	>2,0	Sí
PK-1	Ninguna	>2,0	Sí
PANC-1	Ninguna	>2,0	Sí
Panc03.27	Ninguna	>2,0	Sí
SUIT-2	Ninguna	>2,0	Sí
YAPC	Ninguna	>2,0	Sí
PANC-05-04	Ninguna	>2,0	Sí

TABLA 4

ID de la muestra (Línea celular)	Mutación LOF potencial	Proliferación CI_{50}	Inhibición de la vía
KP-2	Ninguna	>2,0	Sí
KP-3	Ninguna	>2,0	Sí
PA-TU-8902	Ninguna	>2,0	Sí
PK-59	Ninguna	>2,0	Sí
SW1990	Ninguna	>2,0	Sí
Tcc-Pan2	Ninguna	>2,0	Sí
HUP-T3	Ninguna	>2,0	Sí
PA-TU-8902	Ninguna	>2,0	Sí
SU8686	Ninguna	>2,0	Sí
KP-1NL	Ninguna	>2,0	Sí
SW1990	Ninguna	>2,0	Sí
PK-59	Ninguna	>2,0	Sí
PSN-1	Ninguna	>2,0	Sí
HUP-T3	Ninguna	>2,0	Sí
Capan-1	Ninguna	NA	No
KLM-1	Ninguna	NA	NA
HuCCT1	Ninguna	NA	NA
MiaPaca	Ninguna	NA	No
PK-45H	Ninguna	NA	No
DANG	Ninguna	NA	No
Panc-04-03	Ninguna	NA	No
QGP-1	Ninguna	NA	No

Ejemplo 4

La mutación inactivadora de RNF43 confiere dependencia de Wnt en el cáncer pancreático

En este ejemplo, los autores muestran que RNF43 inhibe la señalización Wnt/β-catenina y reduce el nivel de membrana de Frizzled en células de cáncer pancreático como mecanismo de retroalimentación negativa. La inhibición de la señalización Wnt endógena aumentó el nivel en la superficie celular de Frizzled.

Se estudiaron múltiples líneas celulares de cáncer pancreático para determinar la dependencia de Wnt usando LGK974, un inhibidor de Porcupina que bloquea la secreción de Wnt. Las células de cáncer pancreático se cultivaron en el medio recomendado por ATCC complementado con un 10% de FBS.

Sorprendentemente, todas las líneas sensibles al inhibidor de Porcupina portan la mutación inactivadora de RNF43. La inhibición de la secreción de Wnt o el agotamiento de β-catenina inhibe la proliferación de células tumorales pancreáticas con RNF43 mutante pero no con RNF TN. La reintroducción de RNF43 de tipo natural en líneas con RNF43 mutante también inhibe su proliferación. LGK974 inhibe el crecimiento de tumores pancreáticos mutantes para RNF43 *in vivo*. Los datos de los autores muestran que la mutación de RNF43 en el cáncer pancreático confiere dependencia de Wnt y la mutación de RNF43 se debe utilizar como un biomarcador para la selección de pacientes para el desarrollo de inhibidores de Wnt.

Se han identificado tres líneas celulares de cáncer pancreático dependientes de Wnt usando el inhibidor de Porcupina LGK974, y sorprendentemente todas estas líneas celulares albergan mutaciones de pérdida de la función en RNF43. El crecimiento de estas líneas celulares con RNF43 mutante se inhibe tras el agotamiento de β-catenina o la reexpresión de RNF43, y LGK974 inhibe su crecimiento. Los datos de los autores establecen que RNF43 es un supresor tumoral en el cáncer pancreático y muestran que la mutación de RNF43 se puede utilizar como un biomarcador para predecir la eficacia de los agentes que tienen como diana la vía de señalización Wnt.

Los autores estudiaron un conjunto de 39 líneas celulares de cáncer pancreático para determinar la dependencia de Wnt usando LGK974, un inhibidor de Porcupina que actualmente se está examinando en la clínica. Sorprendentemente, todas las líneas sensibles a LGK974 portan mutaciones inactivadoras de RNF43. La inhibición de la secreción de Wnt, el agotamiento de β-catenina o la expresión de RNF43 de tipo natural bloquearon la proliferación de células de cáncer pancreático con RNF43 mutante pero no con RNF43 de tipo natural. LGK974 inhibió el crecimiento de tumores pancreáticos mutados en RNF43 en modelos de xenoinjerto en ratones.

TABLA 5		
	Ensayo de inhibición del crecimiento en la formación de focos	Inhibición de la vía en el ensayo qPCR Axin2
BxPC3	No	Sí
Capan-1	No	No
Capan-2*	Sí	Sí
CFPAC-1	No	No
DanG	No	No
HPAFII*	Sí	Sí
Hs766T	No	ND
HuPT3	No	Sí
HuPT4	No	No
KCl-MOH1	No	ND
KLM1	No	ND
KP1-N	No	Sí
KP-1NL	No	Sí
KP2	No	Sí
KP3	No	Sí
KP4	No	No
L3.3	No	No
MIA CaPa-2	No	No
PANC-1	No	Sí
Pan02.03	No	ND
Panc03.27	No	Sí
Panc04.03	No	No
Panc05.04	No	Sí
Panc08.13	No	ND
Panc10.05*	No	Sí
PaTu-8902	No	Sí
PaTu-8988S*	Sí	Sí
PaTu-8988T*	No	Sí
PK45H	No	No
PK1	No	Sí
PK59	No	Sí
PL45*	No	No
PSN-1	No	Sí
QGP-1	No	No
SU86.86	No	Sí
SUIT-2	No	Sí
SW1990	No	Sí
T3M4	No	No
YAPC	No	Sí
*líneas celulares con mutación inactivadora de RNF43		
ND: no determinado		

Para analizar la formación de focos, se sembraron 6000~12 000 células de las líneas celulares indicadas en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos en 2 mL de medio de cultivo. Después de cultivar durante toda la noche para la adherencia de las células, se reemplazó el medio con medio de cultivo fresco que contenía LGK974 1µM en ausencia y presencia de Wnt3a recombinante. Para el experimento con ARNhc de β-catenina inducible con DOX, las células se trataron con 5 ng/mL de doxiciclina. Cuando las colonias celulares alcanzaron el tamaño deseable, las células se fijaron con un 4% de formalina en PBS y se tiñeron con solución de cristal violeta. Después de unos pocos lavados, las placas se secaron y se obtuvieron las imágenes.

Para la retrotranscripción y PCR cuantitativa (qPCR), se extrajo el ARN total de las células o tumores utilizando el Mini Kit RNeasy Plus (Qiagen). Se retrotranscribió 1 µg de ARN con los reactivos de retrotranscripción Taqman (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la PCR cuantitativa en reacciones de 12 µL constituidas por 0,6 µL de sonda Taqman 20X y mezcla de cebador para PCR, 6 µL de la mezcla maestra 2X Taqman FAST Advanced (Applied Biosystems) y 5,4 µL de molde de ADNc diluido. Las condiciones de termociclado utilizadas fueron 20 segundos a 95 ºC, después 40 ciclos de 1 segundo a 95 ºC y 20 segundos a 60 ºC. Todos los experimentos se realizaron por cuadriplicado. El análisis de la expresión génica se realizó utilizando el método ΔΔCT comparativo y se normalizaron con el gen de mantenimiento GUSB o 18S. Las sondas Taqman se adquirieron de Applied Biosystems.

Regulación negativa de la señalización Wnt por RNF43 en células de cáncer pancreático

El agotamiento de RNF43 incrementa STF inducido por Wnt. Ya que RNF43 está mutado con frecuencia en los tumores pancreáticos císticos (Furukawa T *et al.*(2011) *Sci. Rep.* 1:161; Wu J *et al.* (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(52): 21188-93), RNF43 podría ser un regulador esencial de la señalización Wnt/β-catenina en células de cáncer pancreático. En consecuencia, los autores realizaron experimentos de pérdida de la función en YAPC, una línea celular de cáncer pancreático. El agotamiento de RNF43 utilizando ARNip independientes incrementó significativamente la actividad indicadora de Wnt SuperTOPFlash (STF), en ausencia o en presencia de medio condicionado con Wnt3a exógeno. Véase la FIG. 3(a).

Para el ensayo indicador de luciferasa, las células indicadoras YAPC-STF se transfectaron con ARNip y se trataron con medio acondicionado con Wnt3a o compuesto cuando procedió. Los ensayos de SFT luciferasa se realizaron utilizando kits de ensayo de luciferasa BrighGlo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para construir las líneas celulares pancreáticas que expresan el indicador SFT, las células HEK293 se cultivaron en el medio recomendado por ATCC complementado con un 10% de FBS. Se produjo retrovirus o lentivirus a partir de células HEK293 mediante un procedimiento de empaquetamiento del virus estándar utilizando reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche). Se generaron líneas celulares pancreáticas que expresaban el indicador STF, constructos de RNF43 o ARNhc de β-catenina inducible con DOX mediante infección viral y selección farmacológica.

La transfección con ARNip se realizó utilizando el reactivo de transfección Dharmafect 1 (Dharmacon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los ARNip se enumeran de la siguiente manera: pGL2 (Dharmacon D-001100-01), secuencia diana, 5' -CGTACGCGGAATACTTCGA-3'; RNF43-1 (Dharmacon J-007004-12), secuencia diana, 5' -GGUGGAGUCUGAAAGAUCA-3'; RNF43-2 (Dharmacon J-007004-11), secuencia diana, 5' -GGAGAAAGCUAUUGCACAG -3'; CTNNB1- 1 (Dharmacon J-003482-10), secuencia diana, 5' -UAAUGAGGACCUAUACUUA -3'; y CTNNB1- 2 (Dharmacon J-003482-12), secuencia diana, 5' -GGUACGAGCUGCUAUGUUC-3'.

El agotamiento de RNF43 induce la fosforilación de Dvl y la estabilización de β-catenina. LGK974 es un inhibidor de Porcupina que inhibe con potencia la secreción de Wnt y en la actualidad está en evaluación clínica. La actividad STF inducida por ARNip de RNF43 en ausencia de Wnt3a exógena está inhibida por LGK974 y un inhibidor de Porcupina conocido con anterioridad IWP-2. Chen B *et al.* (2009) *Nat. Chem. Biol.* 5(2):100-7. Véase la FIG. 3(b), que muestra que esta actividad depende de la expresión de las proteínas Wnt endógenas. Estos resultados muestran que RNF43 suprime activamente la señalización Wnt/β-catenina autocrina en células YAPC.

La detección de RNF43 incrementa el nivel de FZD según FACS. A continuación, los autores realizaron ensayos bioquímicos para caracterizar la función de RNF43 en células YAPC. El agotamiento de RNF43 incrementó el nivel de β-catenina citosólica, en consonancia con un incremento de la actividad del indicador STF.

Dishevelled (DVL) es una proteína de señalización intracelular posterior a Frizzled, y su fosforilación está estimulada por Frizzled. El agotamiento de RNF43 incrementó la fosforilación de DVL2 en un ensayo de inmunohistoquímica. Se obtuvo un anticuerpo anti-DVL de Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.

Ciertamente, el agotamiento de RNF43 redujo drásticamente el nivel en la superficie celular de Frizzled, según un ensayo de citometría de flujo utilizando el anticuerpo pan-Frizzled 18R5. La TABLA 6 muestra que el agotamiento de RNF43 incrementa el nivel en la superficie celular de Frizzled (FZD). Se transfectaron células YAPC con el ARNip indicado, y los niveles de la membrana de Frizzled se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo pan-Frizzled 18R5.

TABLA 6

Regulación negativa de la señalización Wnt por RNF43 en células de cáncer pancreático

ARNip	Intensidad de FZD mediana en FACS
ARNip de pGL2	237
ARNip de RNF43 n.º 1	1498
ARNip de RNF43 n.º 2	1751
Sin tinción	33

Para los análisis de citometría de flujo, se recolectaron las células utilizando tampón de disociación celular sin tripsina (Invitrogen) y se resuspendieron en tampón FACS (PBS con un 1% de BSA y un 0,02% de azida de sodio). Después del bloqueo, las células se incubaron con anticuerpo anti-pan-Frizzled (18R5) durante 1 hora a 4 ºC, después se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con aloficocianina (APC). Después de lavados exhaustivos utilizando tampón FACS, las células se tiñeron con yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) y se sometieron a un análisis multicanal utilizando el citómetro de flujo BD LSR II. Las señales de la fluorescencia de células negativas para PI se muestran en los gráficos de tipo histograma.

La sobreexpresión de RNF43 de tipo natural disminuye FZD de la membrana. Para descartar la posibilidad de que el efecto del ARNip de RNF43 esté mediado por una actividad inespecífica, los autores llevaron a cabo un experimento de rescate del ADNc expresando de manera estable ADNc de RNF43 resistente a ARNip en células YAPC.

La expresión de RNF43 resistente a ARNip anuló en gran medida el efecto del ARNip de RNF43 en los niveles de Frizzled, de manera que la actividad del ARNip de RNF43 es específico.

La sobreexpresión de RNF43ΔRING incrementa FZD en la membrana. El agotamiento de RNF43 también incrementó la expresión de AXIN2, un gen diana de β-catenina, y este efecto también se vio anulado por la expresión de RNF43 resistente a ARNip. Véase la FIG. 3(c).

Se generaron ADNc de RNF43 resistente a ARNip de RNF43, RNF43 ΔRING (que carece de los aminoácidos 272-312) y F69C mutante mediante PCR con mutagénesis en dos pasos y se clonaron en varios vectores de expresión de mamíferos. El plásmido indicador pLenti6-STF y el plásmido viral de ARNhc de β-catenina se han descrito previamente en Hao H-X *et al*. (2012) *Nature* 485(7397): 195-200.

Basándose en los valores de ciclo umbral (Ct) que los autores observaron en un ensayo de PCR cuantitativa, RNF43 se expresa de manera dominante en comparación con ZNRF43 en las células YAPC. Los resultados de los autores muestran que RNF43 regula de manera negativa la señalización Wnt mediante la reducción de la expresión en la membrana de Frizzled en las células pancreáticas.

RNF43 se expresa en un nivel más elevado que ZNRF3 en YAPC de cáncer pancreático según pPCR, lo que concuerda con su importancia en la regulación de la señalización Wnt. La señalización Wnt/β-catenina promueve el desarrollo del compartimento exocrino del páncreas y la expresión ectópica de la proliferación por β-catenina estabilizada de células acinosas. Heiser PW *et al*. (2006) *Development* 133(10): 2023-32. Los autores han demostrado previamente que las proteínas R-espondinas estimulan la señalización Wnt al inhibir ZNRF3 y RNF43 y estabilizar Frizzled. Hao HX *et al*. (2012) *Nature* 485(7397): 195-200.

La señalización Wnt/β-catenina suprime la expresión en la membrana de Frizzled

La señalización Wnt/β-catenina regula de manera negativa la expresión en la membrana de FZD. El inhibidor de Porcupina LGK974 incrementa el nivel en la membrana de FZD. Se ha mostrado que RNF43 y ZNRF3 son genes diana de β-catenina. Hao HX *et al*. (2012) *Nature* 485(7397): 195-200; Koo BK *et al*. (2012) *Nature* 488(7413): 665-9. Sin embargo, el efecto de la señalización Wnt/β-catenina endógena en la expresión de Frizzled no se ha estudiado.

Los autores observaron por citometría de flujo que ARNip de β-catenina independientes incrementaban significativamente el nivel en la superficie celular de Frizzled en células YAPC. El agotamiento de β-catenina también reduce los niveles de ARNm de los genes diana de β-catenina AXIN2 y RNF43. Véase la FIG. 4(a). La TABLA 7 muestra que el agotamiento de β-catenina incrementa el nivel de la superficie celular de Frizzled. Se transfectaron células YAPC con el ARNip indicado y se analizaron los niveles en la membrana de Frizzled por citometría de flujo.

TABLA 7

La señalización Wnt/β-catenina suprime la expresión en la membrana de Frizzled en células de cáncer pancreático

ARNip	Intensidad de FZD mediana en FACS
ARNip de pGL2	137
ARNip de P-catenina n.º 1 !	530
ARNip de β-catenina n.º 2	561
Sin tinción	37

En consonancia con esta observación, el tratamiento con el inhibidor de Porcupina IWP2 o LGK974 incrementó el nivel de la superficie celular de Frizzled y disminuyó los niveles de ARNm de AXIN2 y RNF43. Véase la FIG. 4(b). La TABLA 8 muestra que los inhibidores de Porcupina incrementan el nivel en la superficie celular de Frizzled. Se trataron células YAPC con IWP-2 3 μM o LGK974 1 μM, y se sometieron a análisis por citometría de flujo para determinar la expresión en la membrana de Frizzled.

TABLA 8	
La señalización Wnt/β-catenina suprime la expresión en la membrana de Frizzled en células de cáncer pancreático	
Compuesto	Intensidad de FZD mediana en FACS
DMSO	721
IWP-2	1754
LGK974	1373
Sin tinción	64

Estos resultados muestran que la señalización Wnt/β-catenina inhibe de forma potente el nivel en la membrana de Frizzled.

Caracterización de la mutación de RNF43 en tumores pancreáticos

Identificación de líneas de cáncer pancreático que contienen la mutación inactivadora de RNF43. El descubrimiento de LGK974, un inhibidor potente y selectivo de Porcupina, ofreció a los autores una herramienta química única para examinar sistémicamente la dependencia de Wnt en un conjunto grande de líneas celulares de cáncer. Los autores estudiaron LGK974 en un conjunto grande de líneas celulares de cáncer pancreático utilizando el ensayo de formación de focos. Se utilizó el ensayo de formación de focos porque es más sensible que los ensayos de crecimiento habituales tales como CellTiter-Glo, y se ve menos afectado por las diferentes tasas de crecimiento de las diversas líneas celulares. De las 39 líneas celulares pancreáticas cribadas, LGK974 únicamente mostró una potente actividad inhibidora del crecimiento en tres líneas celulares, PaTu-8988S, HPAFII y Capan-2.

A continuación, los autores buscaron determinar la lesión genética que podría conferir dependencia de Wnt. RNF43 es el único regulador negativo conocido en la parte anterior de la vía Wnt mutada en el cáncer. Por esta razón, los autores realizaron la secuenciación de exones de RNF43 en todas las líneas celulares de cáncer pancreático. Sorprendentemente, las tres líneas celulares sensibles a LGK974 tienen mutaciones homocigóticas de RNF43 (HPAFII, E174X; PaTu-8988S, F69C; Capan-2, R330fs). Las mutaciones E174X y R330fs truncan la mayoría de la proteína RNF43 y muy probablemente inactivan la proteína. La consecuencia de la mutación F69C, que introduce una cistina extra en el dominio extracelular de RNF43, está menos clara.

Las mutaciones en las líneas celulares se determinaron mediante análisis de la secuenciación genómica. Para el análisis de la secuenciación en general se extrajo el ADN genómico utilizando el minikit de ADN QIAmp (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los exones de RNF43 se amplificaron mediante PCR y se secuenciaron utilizando la plataforma de Applied Biosystems.

Para definir la función de la mutación F69C, los autores expresaron de manera estable RNF43 de tipo natural con una etiqueta HA en el extremo C, RNF43 ΔRING y RNF43 F69C en células YAPC.

Se adquirió ADNc de RNF43 humano completo (NM_017763.4) de Open Biosystems y se etiquetó con un epítopo de HA en el extremo C mediante PCR. Se generaron ADNc de RNF43 resistente a ARNip de RNF43, RNF43 ΔRING (que carece de los aminoácidos 272-312) y F69C mutante mediante PCR con mutagénesis en dos pasos y se clonaron en varios vectores de expresión de mamíferos. El plásmido indicador pLenti6-STF y el plásmido viral de ARNhc de β-catenina se han descrito previamente en Hao H-X *et al.* (2012) *Nature* 485(7397): 195-200.

En consonancia con la función de RNF43 en la regulación del recambio de Frizzled, la sobreexpresión de RNF43 de tipo natural disminuyó el nivel en la membrana de Frizzled, mientras que la sobreexpresión de RNF43 ΔRING mostró una actividad negativa dominante e incrementó el nivel en la membrana de Frizzled. La sobreexpresión de RNF43 F69C incrementó de manera moderada el nivel en la membrana de Frizzled, de modo que F69C es un mutante con pérdida de la función y tiene una actividad negativa dominante parcial tras la sobreexpresión.

La TABLA 9 muestra el análisis por citometría de flujo de Frizzled en la membrana en células YAPC que expresan de manera estable el vector vacío (VV), RNF43 de tipo natural (TN) o RNF43 mutante (ΔRING o F69C).

TABLA 9	
Células	Reexpresión de RNF43
VV	1040
Tipo natural	686
ΔRING	2004
F69C	1501
Sin tinción	64

Además, la sobreexpresión de RNF43 ΔRING, y en menor medida para RNF43 F69C, incrementó la fosforilación de DVL2 y potencia la actividad indicadora STF inducida por Wnt3a. Estos datos demuestran que F69C es una mutación de cambio de sentido inactivadora para RNF43.

El agotamiento de RNF43 incrementó la expresión en la membrana de FZD en una célula con RNF43 de tipo natural, pero no RNF43 mutante. A continuación, los autores examinaron la función de RNF43 en estas líneas celulares de cáncer pancreático. Aunque el agotamiento de RNF43 incrementó la fosforilación de DVL2 en YAPC y PK1, dos líneas celulares de cáncer pancreático con RNF43 de tipo natural, el agotamiento de RNF43 en células HPAFII, PaTu-8988S y Capan-2 no incrementó la fosforilación de DVL2. En consecuencia, el agotamiento de RNF43 incrementó el nivel en la superficie celular de Frizzled en líneas celulares de cáncer pancreático con RNF43 de tipo natural (YAPC y PK1), pero no con RNF43 mutante (HPAFII, PaTu-8988S y Capan-2). En conjunto, estos resultados muestran que el nivel de Frizzled ya no está inhibido por RNF43 en líneas celulares de cáncer pancreático con mutación en RNF43.

La TABLA 10 muestra un análisis por citometría de flujo de Frizzled en la membrana en líneas celulares de cáncer pancreático tratadas con ARNip de RNF43.

TABLA 10

Intensidad de FZD media en FACS

Células	ARNip de pGL2	ARNip de RNF43	sin tinción
	353	1224	32
PK1	473	923	32
HPAFII	375	402	23
PaTu-8988S	293	245	34
Capan-2	2437	2643	23

La mutación en RNF43 predice sensibilidad a la inhibición de Wnt en tumores pancreáticos

LGK974 disminuye la β-catenina citosólica en todas la líneas celulares. A continuación, los autores caracterizaron la dependencia de Wnt en las líneas celulares de cáncer pancreático. En el ensayo de formación de focos, LGK974 inhibió de manera potente el crecimiento de PaTu-8988S, HPAFII y Capan-2, sin un efecto significativo en PK1 y YAPC (véase la TABLA 6). De manera importante, el efecto inhibidor del crecimiento de LGK974 en células con RNF43 mutante es rescatado por Wnt3a exógena, de manera que el efecto de LGK974 está mediado por el bloqueo de la secreción de Wnt. (Las líneas celulares de cáncer pancreático fueron tratadas con DMSO, LGK974 1 μM o LGK974 junto con Wnt3a recombinante en un ensayo de formación de focos.) Los ensayos de inmunotransferencia y qPCR indicaron que LGK974 disminuía la expresión de MYC, un gen diana de β-catenina, e incrementaba la expresión del inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas p21 en líneas celulares con RNF43 mutante pero no con RNF43 de tipo natural. LGK974 disminuyó la β-catenina citosólica y disminuyó la expresión del gen diana de β-catenina AXIN2 tanto en líneas celulares con RNF43 mutante como RNF43 de tipo natural, de manera que todas estas líneas celulares tiene una señalización Wnt autocrina activa.

Además, LGK974 indujo la expresión del marcador de diferenciación MUC2, MUC5A/C en las células con RNF43 mutante. LGK974 bloqueó la incorporación de EDU en las líneas celulares con RNF43 mutante, de manera que la inhibición de Wnt en estas células condujo a la detención del ciclo celular. La inhibición del crecimiento y la diferenciación celular inducidas por LGK974 de las células con RNF43 mutante también son obvias utilizando la tinción de Ki67 (anti-Ki67 (SP6) de Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU. 94010) y la tinción con azul alcián. Además, LGK974 inhibió de manera potente la proliferación de PaTu-8988S y HPAFII, pero no de PK1, en el ensayo en agar blando. Capan-2 no se estudió ya que no crece en el ensayo en agar blando. En conjunto, estos resultados muestran que la inhibición de la señalización Wnt autocrina en células con RNF43 mutante induce la parada del crecimiento celular y la diferenciación celular.

Para el ensayo en agar blando, las células se suspendieron en 250 μL de un agarosa de bajo punto de fusión (Lonza) al 0,3% en DMEM que contenía un 10% de FBS y se sembraron en 250 μL de DMEM que contenía un 0,8% de agarosa en estado sólido en placas de cultivo de 48 pocillos con una densidad de 5000-10 000 células por pocillo. Se añadieron 250 μL de medio de cultivo sobre las células después de que la placa se enfriara a TA durante 30 minutos. A continuación, la placa se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO_2. Las células se trataron con medio de cultivo fresco que contenía DMSO o LGK974 1 μM cada 3-4 días. Cuando las colonias alcanzaron el tamaño deseable, se tomaron fotografías y las colonias se tiñeron con azul Alamar (de Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU. 14072) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos experimentos se repitieron tres veces y al menos cuatro pocillos fueron replicados cada vez para cada condición.

Para el ensayo de proliferación EdU, las células se colocaron en medio de cultivo en una placa de 96 pocillos con una densidad de 6000-12 000 células por pocillo, y se trataron con DMSO o LGK974 1 µM. Después de 3 días, las células se trataron con medio de cultivo fresco que contenía EdU 20 µM, que estaba incluido en el kit de ensayo Click-iT EdU Alexa Fluor 488 HCS (Invitrogen) y la placa se incubó durante 2 h a 37 ºC en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO_2. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% final durante 30 min, se lavaron con PBS, se permeabilizaron y se tiñeron con PBS con un 0,75% de TritónX-100 y 50 µg/mL de Hoechst durante 30 min. Después del lavado, las células se dispusieron para la detección de EdU de acuerdo con las instrucciones del ensayo Click-iT EdU. Se realizaron ensayos triplicados para cada condición.

El procedimiento con azul Alcián de la mucina es de la siguiente manera: las líneas celulares de cáncer pancreático se colocaron en matraces de cultivo tisular de 225 cm^3 con varias densidades, y se trataron con DMSO o LGK974 (100 nM) durante 72 horas. Los sedimentos celulares se recolectaron eliminando el medio, lavando con 1x PBS y añadiendo 10 mL de formalina tamponada al 10%. A continuación, se rasparon las células del fondo del matraz y se colocaron en un tubo cónico de 50 mL, se rellenaron hasta ~50 mL con formalina tamponada al 10%, y se permitió que se fijaran durante 1-2 horas. El tubo cónico que contenía las células fijadas se centrifugó a continuación a 1200 rpm durante 5 min y las células sedimentadas se envolvieron en papel para lentes, se colocaron en un casete de histología, se procesaron y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones FFPE de 5 µm, se montaron en portaobjetos, calentaron a 60 ºC durante al menos 30 minutos y se desparafinaron. Los portaobjetos se lavaron a continuación dos veces con H_2O, se transfirieron a ácido acético acuoso al 3% durante 3 minutos y se movieron directamente a azul Alcián al 1% en ácido acético al 3%, pH 1 durante 30 minutos. A continuación, los portaobjetos se colocaron en una corriente de agua durante 10 minutos tras los cuales se lavaron con H_2O destilada antes de colocarlos en rojo rápido nuclear al 0,1% (Kernechtrot) durante 5 minutos. Los portaobjetos se lavaron de nuevo en una corriente de agua y a continuación, se deshidrataron. Por último, los portaobjetos se cubrieron con Permaslip®.

Para la inmunotransferencia, los lisados celulares totales se prepararon sometiendo las células a lisis utilizando tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, EDTA 1 mM) complementado con inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas, lo cual fue seguido por una centrifugación a 14 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Para la extracción de β-catenina citosólica, se resuspendieron los sedimentos celulares en tampón hipotónico (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y KCl 10 mM, complementado con inhibidores de proteasas/fosfatasas) y se sometieron a lisis mediante ciclos de congelación-descongelación. Se resolvieron cantidades idénticas de proteínas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos primarios durante toda la nocha a 4 ºC. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con o bien HRP o tintes infrarrojos para la visualización de la señal mediante película de ECL o un escáner LI-COR Odyssey, respectivamente.

LGK974 inhibe MYC e induce la expresión de la proteína p21 en líneas de cáncer pancreático con RNF43 mutante pero no con RNF43 de tipo natural. Las proteínas Frizzled potencian tanto la señalización Wnt/β-catenina canónica como la señalización Wnt no canónica, de modo que la inactivación debida a una mutación de RNF43 se esperaría que incrementase tanto la señalización Wnt canónica como no canónica. Para determinar la contribución de la señalización Wnt/β-catenina al crecimiento celular de las líneas pancreáticas estudiadas por los autores, estos utilizaron ARNhc de β-catenina. La expresión inducible de un ARNhc de β-catenina validado con anterioridad (Scholer-Dahirel A *et al.* (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(41): 17135-40) inhibió de manera potente la proliferación de las líneas de cáncer pancreático con RNF43 mutante (PaTu-8988S, HPAFII y Capan-2), pero no RNF43 de tipo natural (PK1 y YAPC). El agotamiento de β-catenina también disminuyó la expresión del gen diana de β-catenina AXIN2 y MYC (se puede adquirir anti-MYC de Abcam, Cambridge, MA, EE. UU. 02139), e incrementó la expresión de p21 (se puede adquirir anti-p21 de Millipore, Bedford, MA, EE. UU. 01730), MUC2 y MUC5A/C en líneas celulares con RNF43 mutante. Estos resultados muestran que es probable que el efecto de LGK974 en el crecimiento celular esté mediado por la señalización Wnt/β-catenina canónica.

A continuación, los autores examinaron si la mutación en RNF43 es necesaria para el crecimiento de las células con RNF43 mutante. Los autores observaron que la expresión de RNF43 de tipo natural, pero no LacZ o RNF43 ΔRING, inhibió de manera significativa la proliferación de células PaTu-8988S y Capan-2 con RNF mutado, mientras que no tuvo efecto en células YAPC con RNF43 de tipo natural. La sobreexpresión de RNF43 de tipo natural presuntamente supera la actividad dominante minoritaria de RNF43 F69C expresado de manera endógena en células PaTu-8988S. HPAFII no se puede estudiar en este ensayo ya que la eficacia de infección viral en esta línea celular es demasiada baja y los autores no pudieron obtener células infectadas de manera estable utilizando retrovirus que expresaban LacZ o RNF43 ΔRING.

En conjunto, los resultados de los autores muestran que la señalización Wnt/β-catenina potenciada por la mutación de RNF43 es necesaria para la proliferación de células de cáncer pancreático con RNF43 mutante, y que la supresión de la señalización Wnt/β-catenina en estas células induce la detención del ciclo celular y la inducción de los marcadores de diferenciación.

El bloqueo de la secreción de Wnt inhibe el crecimiento de tumores pancreáticos con RNF43 mutante in vivo. Para analizar la función de la activación de la vía Wnt en el mantenimiento de tumores pancreáticos con RNF43 mutante *in vivo,* los autores utilizaron dos modelos de xenoinjerto PDAC (HPAFII y Capan-2).

Para la eficacia *in vivo* y los estudios farmacodinámicos, las células se recolectaron a una densidad de un 95-110% de confluencia. Se implantaron por vía subcutánea 10 millones de células (HPAFII) o 3 millones de células (Capan-2) mezcladas 50:50 con membrana basal matriz Matrigel BD (Matrigel) (BD Biosciences) en la región supraaxilar superior derecha de ratones nu/nu (Harlan) (HPAFII) o scid.bg (Harlan) (Capan-2). Los tumores se monitorizaron dos veces a la semana con un calibrador y se calcularon los volúmenes tumorales (VT) utilizando la fórmula elipsoide: $VT(mm^3) = ((l \times w^2) \times 3{,}14159))/6$. Los ratones que portaban xenoinjerto de tumores se distribuyeron aleatoriamente en los grupos de tratamiento (n = 8 por grupo) 14 días después del implante del tumor (Capan-2), cuando el volumen tumoral medio alcanzó 223 mm^3 (intervalo de 200-250 mm^3) u 11 días después del implante (HPAFII), cuando el volumen tumoral medio alcanzó 341 mm^3 (intervalo de 272-418 mm^3). Los ratones se trataron mediante alimentación forzada (p.o.) dos veces al día (BID) con un volumen posológico de 10 mL/kg con vehículo (0,5% de metilcelulosa (MC)/0,5% de Tween 80) o una suspensión de 0,65 mg/mL de la forma salina de fumarato de LGK974 (LGK974-AE-4, factor de conversión del peso molecular de la base libre 1,293) en un 0,5% de MC/0,5% de Tween 80. Las dosis *in vivo* se notifican como equivalentes de base libre. Después del tratamiento durante 14 días (HPAFII) o 35 días (Capan-2), se notificó la actividad antitumoral como valores de porcentaje del tratamiento/control (%T/C) o %Regresión (%REG). La actividad antitumoral se calculó utilizando la siguiente fórmula: $\%T/C = 100\ \Delta\Delta T_t/\Delta C_t$ si $\Delta T_t \geq 0$; o $\%REG = 100\ \Delta\Delta T_t/T_0$ si $\Delta T_t < 0$; donde: T_0 = volumen tumoral (VT) medio del grupo tratado con fármaco en el día de la distribución aleatoria; T_t = VT medio del grupo tratado con fármaco al final del estudio; $\Delta T_t = T_0 - T_t$; C_t = VT medio del grupo de control en el día final del estudio; C_0 = VT medio del grupo de control en el día de la distribución aleatoria; y $\Delta Ct = C_0 - C_t$ *se interpreta que valores %T/C en el intervalo de 100 a 42% no tienen actividad antitumoral; se interpreta que los valores %T/C ≤42% y >10% tienen actividad antitumoral, se interpreta que los valores %T/C ≤ 10% o %REG ≥ -10% son estasis tumoral. Se interpreta que los valores %REG <-10% son regresiones. Se trataron cohortes paralelas, separadas de animales (n = 3 por tratamiento y punto temporal) con vehículo o LGK974 como anteriormente para obtener tejido tumoral para el análisis *ex vivo* de los marcadores farmacodinámicos.

El tratamiento de ratones portadores de xenoinjertos HPAFII con 5 mg/kg de LGK974, p.o. BID durante 14 días dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral (T/C=33%) respecto al tratamiento con vehículo. Además, el tratamiento de ratones portadores de xenoinjertos Capan-2 con 5 mg/kg de LGK974, p.o. BID durante 35 días logró la estasis tumoral (T/C=5%). En consonancia con el mecanismo de acción de LGK974, la expresión del gen diana de β-catenina, AXIN2, se redujo en xenoinjertos de HPAFII y Capan-2 tratados. De manera análoga a los hallazgos *in vitro* en células PDAC con RNF43 mutante, el tratamiento con LGK974 indujo la detención del ciclo celular y la diferenciación dentro de los tumores de xenoinjertos.

Para los análisis inmunohistoquímicos y por imágenes, las muestras de tumores de xenoinjertos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% durante 6-24 horas, se procesaron e incluyeron en parafina. La tinción inmunohistoquímica se realizó en el sistema Ventana Discovery. Se capturaron las imágenes utilizando un Aperio Scanscope. Se analizaron las imágenes de secciones completas de tumores de páncreas y xenoinjerto de ratones con Visiopharm. Para los tumores de xenoinjerto, se excluyó automáticamente el tejido estromal utilizando el módulo Section Assembler. Las regiones necróticas se excluyeron a mano utilizando herramientas de dibujo que proporciona el *software* de análisis. Los tejidos se segmentaron utilizando el módulo TissuemorphDP y la intensidad DAB se cuantificó como porcentaje de núcleos positivos para proteínas nucleares o porcentaje de píxeles positivos para proteínas no confinadas al núcleo.

Discusión.

En este Ejemplo, los autores han demostrado que RNF43 sirve como regulador de retroalimentación negativa de la vía Wnt en células pancreáticas al suprimir la expresión en la membrana de Frizzled. Los autores han mostrado que la señalización Wnt/β-catenina inhibe de manera potente la expresión en la membrana de Frizzled, probablemente mediante la inducción de RNF43. Este hallazgo proporciona una explicación de por qué las células de cáncer pancreático seleccionan mutar RNF43 para escapar de esta potente regulación por retroalimentación negativa y lograr un nivel elevado de señalización Wnt/β-catenina. Los datos de los autores establecen RNF43 como un supresor tumoral en el cáncer pancreático y muestran que la mutación de RNF43 se puede utilizar como un biomarcador para predecir la eficacia de los agentes que tienen como diana la vía de señalización Wnt.

Los autores han observado que LGK974 disminuye la expresión de AXIN2 en 22 de 29 (76%) líneas celulares de cáncer pancreático, de modo que un porcentaje elevado de líneas celulares de cáncer pancreático tienen señalización Wnt autocrina. Sin embargo, el crecimiento de la mayoría de estas líneas celulares no se ve afectado por LGK974 en el ensayo de formación de focos. Sorprendentemente, las tres líneas de cáncer pancreático que muestran una clara sensibilidad a LGK974 en el ensayo de crecimiento portan una mutación de pérdida de la función en RNF43. Estos resultados muestran que los tumores con RNF43 mutados tienen muchas más posibilidades de ser dependientes de Wnt en comparación con los tumores con RNF43 de tipo natural.

Resulta interesante que no todas las líneas celulares con mutaciones en RNF43 son sensibles a LGK974. Los autores han detectado tres líneas de cáncer pancreático que portan una mutación homocigótica de RNF43, Patu-8988T (F69C), Panc10.05 (M18fs) y PL45 (M18fs), pero el crecimiento de estas líneas celulares no es sensible a LGK974. Nótese que Patu-8988S y Patu-8988T procedieron del mismo paciente, y Panc10.05 y PL45 también procedieron del mismo

paciente. Estos resultados muestran que otros mecanismos pueden volver los tumores con RNF43 mutado independientes de la señalización Wnt.

Aumentar el número de pacientes que es más probable que respondan a la terapia en los ensayos clínicos es beneficioso para el desarrollo con éxito de agentes terapéuticos contra el cáncer dirigidos desde un punto de vista molecular, debido a la toxicidad de estos agentes y la heterogeneidad de los tumores a nivel de la lesión molecular. Sin embargo, el desarrollo clínico de estos agentes es difícil porque no se dispone de una buena estrategia para identificar tumores dependientes de Wnt. Una estrategia basada en la sobreexpresión de las proteínas Wnt o la subexpresión de los inhibidores de Wnt no sería lo suficientemente robusta para la selección de pacientes. Ciertamente, muchas líneas PDAC con una clara señalización Wnt/β-catenina autocrina no son dependientes de Wnt para el crecimiento *in vitro*. Además, la señalización de β-catenina se puede activar de manera independiente del ligando, de modo que una estrategia basada en la acumulación nuclear de β-catenina tampoco sería fiable.

El estudio de los autores ha establecido RNF43 como un supresor tumoral que inhibe la señalización Wnt anterior en el cáncer pancreático. Sus hallazgos de que todas las líneas celulares de cáncer pancreático del inhibidor de Wnt sensibles al inhibidor de Wnt *in vitro* portan la mutación de RNF43 muestran que la mutación de RNF43 se puede utilizar como un biomarcador predictivo para seleccionar tumores pancreáticos para un ensayo clínico para estudiar la eficacia de un inhibidor de Wnt.

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de Wnt, que comprende determinar la presencia de una mutación inactivadora en el gen RNF43 en un fluido corporal o tejido de un paciente que puede contener células tumorales o proteínas de células tumorales.

2. El método de la reivindicación 1, donde la presencia de la mutación inactivadora se detecta mediante métodos de secuenciación de ADN.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde la presencia de la mutación inactivadora se detecta mediante la secuenciación de ADN genómico, ADNc o ARN de un tejido canceroso.

4. El método de la reivindicación 1, donde la presencia de la mutación inactivadora se detecta mediante hibridación, reacción en cadena de la polimerasa, análisis en gel de poliacrilamida, cromatografía o espectroscopía.

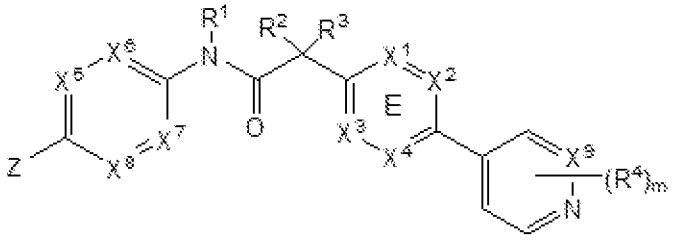
5. El método de la reivindicación 1, donde la mutación inactivadora se detecta mediante un cribado para detectar un producto proteico alterado codificado por el gen, p. ej., mediante inmunotransferencia, electroinmunotransferencia, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y microscopía inmunofluorescente.

6. Un inhibidor de Wnt o una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, donde el inhibidor de Wnt se administra al paciente dependiendo de si se detecta una mutación inactivadora en el gen RNF43 en un fluido corporal o tejido de un paciente que puede contener células tumorales o proteínas de células tumorales, y donde la presencia de una mutación inactivadora en el gen RNF43 se detecta utilizando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5.

7. El inhibidor de Wnt o la composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el cáncer es cáncer pancreático, carcinoma ductal, adenocarcinoma o melanoma.

8. El inhibidor de Wnt o la composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Wnt para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el cáncer es cáncer pancreático.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el inhibidor de Wnt o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 u 8, donde el inhibidor de Wnt es un compuesto de Fórmula (1):



(1)

o una sal fisiológicamente aceptable de este, donde:
X^1, X^2, X^3 y X^4 se seleccionan entre N y CR^7;
uno de X^5, X^6, X^7 y X^8 es N y los otros son CH;
X^9 se selecciona entre N y CH;
Z se selecciona entre fenilo, pirazinilo, piridinilo, piridazinilo y piperazinilo; donde cada fenilo, pirazinilo, piridinilo, piridazinilo o piperazinilo de Z está sustituido opcionalmente con un grupo R^6;
R^1, R^2 y R^3 son hidrógeno;
m es 1;
R^4 se selecciona entre hidrógeno, halo, difluorometilo, trifluorometilo y metilo;
R^6 se selecciona entre hidrógeno, halo y $-C(O)R^{10}$; donde R^{10} es metilo; y
R^7 se selecciona entre hidrógeno, halo, ciano, metilo y trifluorometilo.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el inhibidor de Wnt o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el inhibidor de Wnt es un compuesto seleccionado por el grupo de:

N-[5-(3-fluorofenil)piridin-2-il]-2-[5-metil-6-(piridazin-4-il)piridin-3-il]acetamida;
2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-*N*-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida;
N-(2,3'-bipiridin-6'-il)-2-(2',3-dimetil-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida;
N-(5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-2-(2'-metil-3-(trifluorometil)-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida;
N-(5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-2-(2'-fluoro-3-metil-2,4'-bipiridin-5-il)acetamida; y
2-(2'-fluoro-3-metil-2,4'-bipiridin-5-il)-*N*-(5-(pirazin-2-il)piridin-2-il)acetamida;
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el inhibidor de Wnt o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el inhibidor de Wnt es 2-[5-metil-6-(2-metilpiridin-4-il)piridin-3-il]-*N*-[5-(pirazin-2-il)piridin-2-il]acetamida.

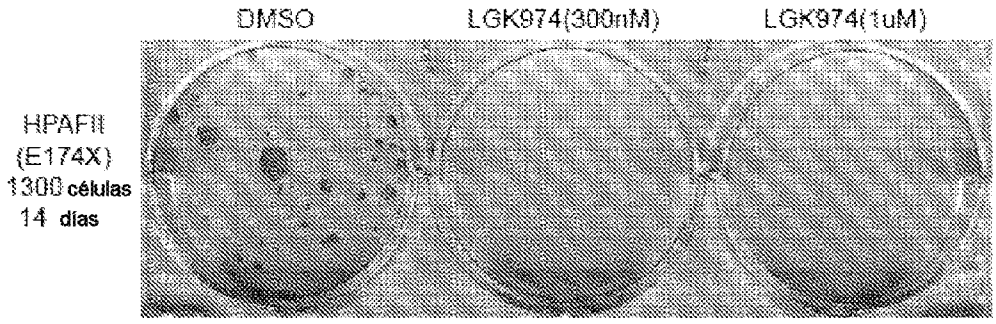

DMSO
LGK974(300nM)
LGK974(1uM)
HPAFII
(E174X)
1300 células
14 días

FIG. 1(a)

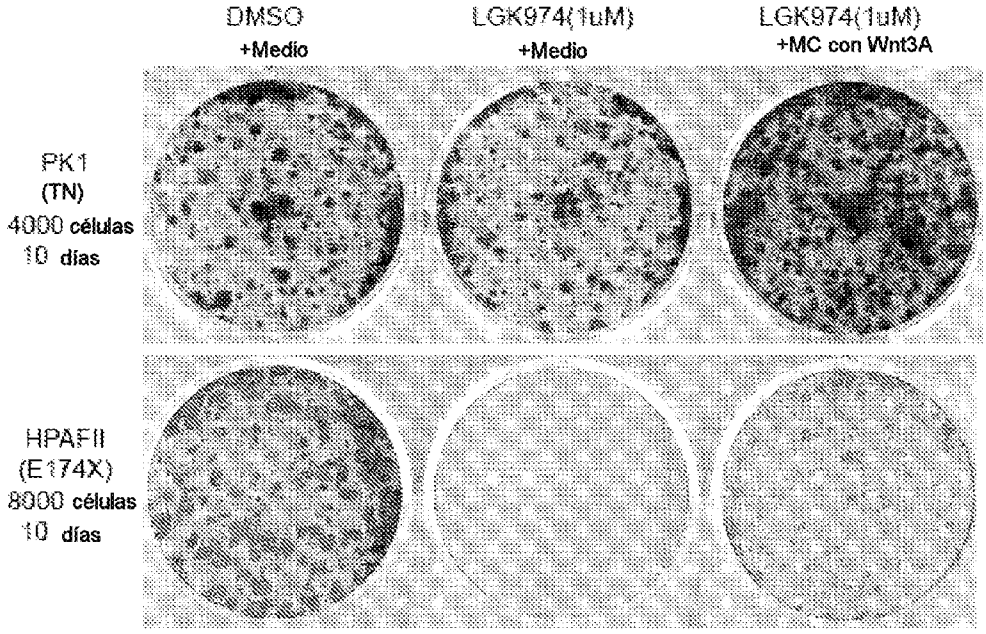

DMSO
+Medio
LGK974(1uM)
+Medio
LGK974(1uM)
+MC con Wnt3A
PK1
(TN)
4000 células
10 días
HPAFII
(E174X)
8000 células
10 días

FIG. 1(b)

```
hRNF43          ---MSGGHQLQLAALWPWLLMATLQAGFGRT----------GLVLAAAVESERSAEQKAI
mRNF43          ---MSGGHQLQLAVLWPWLLMATLHAGFGHT----------GRVLAAAVESERSAEQKAV
hZNRF3          MRPRSGGRPGATGRRRRRLRRRPRGLRCSRLPPPPPLPLLLGLLLAAAGPGAARAKETAF
mZNRF3          MRPRSGGRPGAPGRRRRRLRRGPR---GRRLPPPPPLPLLLGLLLAAAGPGAARAKETAF
                    ***:    .    *   .     :          * :**** .  *::.*.

hRNF43          IRVIPLKMDPTG---KLNLTLEGVFAGVAEITPAEGKLMQSHPLYLCNASDD-DNLEPGF
mRNF43          IRVIPLKMDPTG---KLNLTLEGVFAGVAEVTPAEGKLMQSHPLYLCNASDD-DNLEPGF
hZNRF3          VEVVLFESSPSGDYTTYTTGLTGRFSRAGATLSAEGEIVQMHPLGLCNNNDEEDLYEYGW
mZNRF3          VEVVLFESSPSGDYTTHTTGLTGRFSRAGAMLSAEGEIVQMHPLGLCNNNDEEDLYEYGW
                :.*: :: .*:*   . .  * * *: ..   .***:::* *** *** .*: *  * *:

hRNF43          ISIVKLESPRRAPRPCLSLASKARMAGERGASAVLFDITEDRAAAEQLQQ--PLGLTWPV
mRNF43          ISIVKLESPRRAPRPCLSLASKARMAGERGANAVLFDITEDRSAAEQLQQ--PLGLTKPV
hZNRF3          VGVVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSENPEAIDQLNQGSEDPLKRPV
mZNRF3          VGVVKLEQPELDPKPCLTVLGKAKRAVQRGATAVIFDVSENPEAIDQLNQGSEDPLKRPV
                :.:****.*.  *:***:: .**: * :***.**:**::*:  * :**:*     *. **

hRNF43          VLIWGNDAEKLMEFVYKNQKAHVRIELK---EPPAWPDYDVWILMTVVGTIFVIILASVL
mRNF43          VLIWGSDAAKLMEFVYKNRKAYVWIELK---EPPAGANYDVWILLTVVGTVFVIILASVL
hZNRF3          VYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQHRPPRQPTEYFDMGIFLAFFVVVSLVCLILLVKI
mZNRF3          VYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQHLPPRQPTEYFDMGIFLAFFVVVSLVCLILLVKI
                * : * ** ***::* *:: * . *:     :*.   : .::: : ** ::. :**   :

hRNF43          RIRCRPRHSRPDPLQQRTAWAISQLATRRYQASCRQARGEWPDSGSSCSSAPVCAICLEE
mRNF43          RIRCRPHHSRPDPLQQRTARAISQLATRRYQAGCRRARAEWPDSGSSCSSTPVCAICLEE
hZNRF3          KLKQRRSQNSMNRLAVQALEKMETRKFNSKSKGRREGSCGALDTLS-SSSTSDCAICLEK
mZNRF3          KLKQRRSQNSMNRLAVQALEKMETRKFNSKSKGRREGSCGALDTLS-SGSTSDCAICLEK
                ::: *  :.  : *  ::   :.    . . . *..     *: * ..*:. ******:

hRNF43          FSEGQELRVISCLHEFHRNCVDPWLHQHRTCPLCMFNITEGDSFSQSLGPSRSYQEPGRR
mRNF43          FSEGQELRVISCLHEFHRTCVDPWLYQHRTCPLCMFNIVEGDSFSQAPAASPSYQEPGRR
hZNRF3          YIDGEELRVIPCTHRFHRKCVDPWLLQHHTCPHCRHNIIEQKGNPSAVCVETSNLSRGRQ
mZNRF3          YIDGEELRVIPCTHRFHRKCVDPWLLQHHTCPHCRHNIIEQKGNPGAVCVETSNLTRGRQ
                : :*:*****.* *.***.****** **:*** * .** * .. . :   . *    **:

hRNF43          LHLIRQHPGHAHYHLPAAYLLGPSRSAVARPPRPGPFLPSQEPG----------------
mRNF43          LHLIRQHPGHAHYHLPSAYLLGPSRTSVARTPRPRPFLPSQEPS----------------
hZNRF3          QRVTLPVHYPGRVHRTNAIPAYPIRTSMDSHGNPVTLLTMDRHGEQSLYSPQTPAYIRSY
mZNRF3          PRVTLPVHYPGRVHRTNAIPAYPIRTSMDSHGNPVTLLTMDRHGEQNLYSPQTPTYVRGY
                 ::       .: * . *    *:*:::    .* .:*. :. .

hRNF43          ------------------------MGPRHHRFPRAAHPRAPGEQQRLAGAQHPYAQGWGL
mRNF43          ------------------------MGSRHQRLPRTSHLRAPEEQQHLAVSPHPYAQGWGL
hZNRF3          PPLHLDHSLAAHRCGLEHRAYSPAHPFRRPKLSGRSFSKAACFSQYETMYQHYYFQGLSY
mZNRF3          PPLHLDHTLAPHRCSLEHRAYSPAHPFRRPKFSSRSFSKAACFSQYETMYQHYYFQGLSY
                                       *: ::.  :. :*.  .*  :   * * ** .
```

FIG. 2

```
hRNF43          SHLQSTSQHPAACPVPLRRARPP-----------------------DSSGSGESYCTER
mRNF43          NRLRCTSQHPAACPVALRRARPH-----------------------ESSGSGESYCTER
hZNRF3          PEQEGQSPPSLAFRGPARAFPPSGSGSLLFPTVVHVAPPSHLESGSTSSFSCYHGHRSVC
mZNRF3          PEQEGQTIPSVTPRGQSRAFPPSGASSLLFPTMVHVAPPTHVESGSTSSFSCYHGHRSVC
                 . .  :  . :     *   *                          .* .. ..: :

hRNF43          SGYLADGPASDSS----SGPCHGSSSDSVVNCTDISLQGVHGSSSTFCSSLSSDFDPLVY
mRNF43          SGYLADGPASDSS----SGPCHGSSSDSVVNCTDVSLQGIHGSSSTFRSSLSSDFDPLVY
hZNRF3          SGYLADCPGSDSSSSSSGQCHCSSSDSVVDCTEVSNQGVYGSCSTFRSSLSSDYDPFIY
mZNRF3          SGYLADCPGSDSSSNSS-GQCRCSSSDSVVDCTEVSNQGVYGSCSTFRSSLSSDYDPFIY
                ****** *.****     * *: *******:**::* **::**.*** ******:**::*

hRNF43          CSP-------------------------KGDPQRVDMQPSVTSRPRSLDSVVPTGETQV
mRNF43          CSP-------------------------EGDLQGKGIQPSVTSRPRSLDSVVPRGETQV
hZNRF3          RSRSPCRASEAGGSGSSGRGPALCFEGSPPPEELPAVHSHGAGRGEPWPGPASPSGDQVS
mZNRF3          RSR----------------GPAVHLEGSPPPEELPAGHSQSAGRGEPWLGPASPSGDQLS
                 *                            :     . ..       ... * *:

hRNF43          SSHVHYHRHRHHHYKKRFQWHGRKPGPETGVPQSRPPIPRTQP-----------QPEPP
mRNF43          SSHIHYHRHRHHHYKRQFQWHGRKPGPETGIPQSMPAASHTQL-----------EPSLP
hZNRF3          TCSLEMNYSSNSSLEHRGPNSSTSEVGLEASPGAAPDLRRTWKGGHELPSCACCCEPQPS
mZNRF3          TCSLEMNYSSNSSLEPRGPNSSTSEVGLEVSPGAALDLRRTWKGGPEGPSCACCFEPQPF
                :. :. :   :   : :    . .      * :     :*              :*.

hRNF43          SPDQQVTRSNSAAPSGRLSNPQCPRALPEPAPGPVDASSICPST----SSLFNLQKSSLS
mRNF43          D---QQLITPNPTASSMLPNPQRPRALTEPAPGLAEASSPSPSPKPNPSGLLNLQKSSLT
hZNRF3          P-AGPSAGAAGSSTLFLGPHLYEGSGPAGGEPQSGSSQGLYGLHPDHLPRTDGVKYEGLP
mZNRF3          PPGSGIETSAGGSSLFLGPRLLEDCNPPSGEPQLGSSQGLYGLHSDHYPRTDGVKYEGLP
                        : . :.    ..       .   *   .:..         .   .:: ..*.

hRNF43          ARHPQRKRRGGPSEPTPGSRPQDATVHPACQIFPHYTPSVAYPWSPEAHPLICGPPGLDK
mRNF43          VRHPHRKRRGGPSEPLPTSLPPDLTVHTACPVFPHYSPRLAYPWPPEVHPLMFRPPGPDR
hZNRF3          CCFYEEKQVARGGGGGSGCYTEDYSVSVQYTLTEEPPPGCYPGARDLSQRIPIIPEDVDC
mZNRF3          CCFYEEKQVAHSAGRGNGCYTEDYSVSVQYTLTEEPPPSCYAGPRDLSQRIPIIPEDVDC
                  . ..*: .  .     . . * :*     :  . .*          : :   * . *

hRNF43          RLLPETPGPCYSNSQPVWLCLTPRQPLEPHPPGEGPSEWSSDTAEGRPCPYPHCQVLSAQ
mRNF43          RLLHEVPGPCYSSSQPVWLYLNPCQPLGPCLPGEGHSKWTFDSPEGRRCPYSHCQVLPAQ
hZNRF3          DLGLPSDCQGTHSLGSWGGTRGPDTPRPHRGLGATREEERALCCQARALLRPGCPPEEAG
mZNRF3          DLGLPQDCHGMHNHSPWGGALSLDVPRLHWSLGTTREEE--QAPCYQAEVQPGCSPEEAG
                 *          .  .         *      *   .:        :    . *    *

hRNF43          PGSEEELEELCEQAV----------------------
mRNF43          PGSEEELEELCEQAV----------------------
hZNRF3          AVRANFPSALQDTQESSTTATEAAGPRSHSADSSSPGA
mZNRF3          ASRASLSSAPQDTQESHALAAEASGPGSGPGIGTGA--
```

FIG. 2 (CONTINUACIÓN)

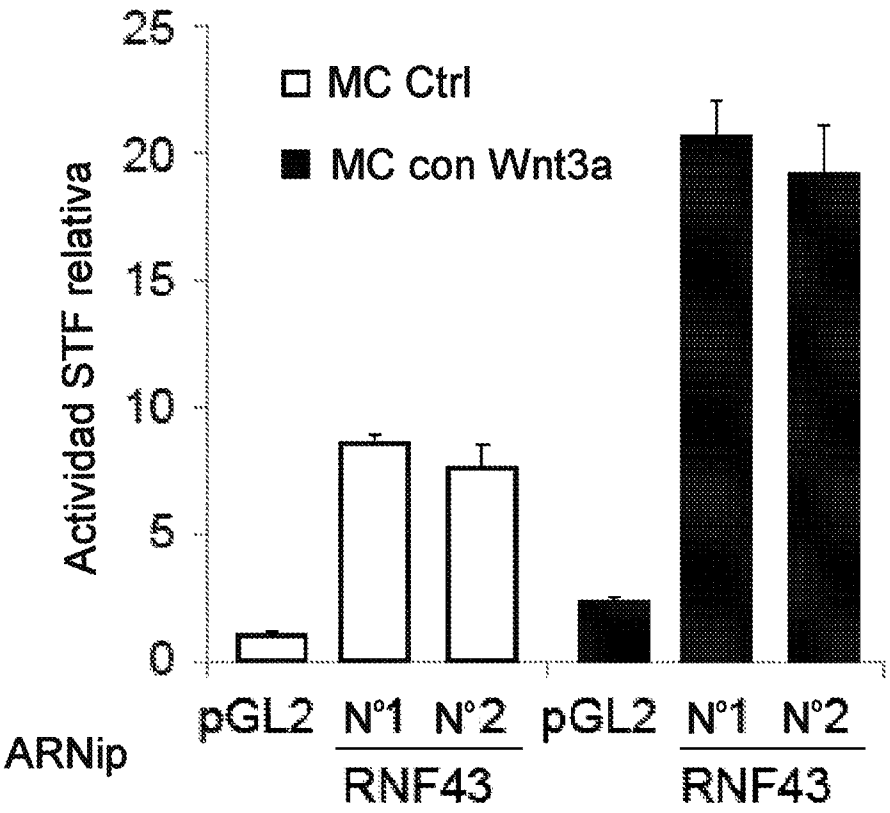

25
20
15
10
5
0
Actividad STF relativa
MC Ctrl
MC con Wnt3a
pGL2
N°1
N°2
pGL2
N°1
N°2
ARNip
RNF43
RNF43

FIG. 3(a)

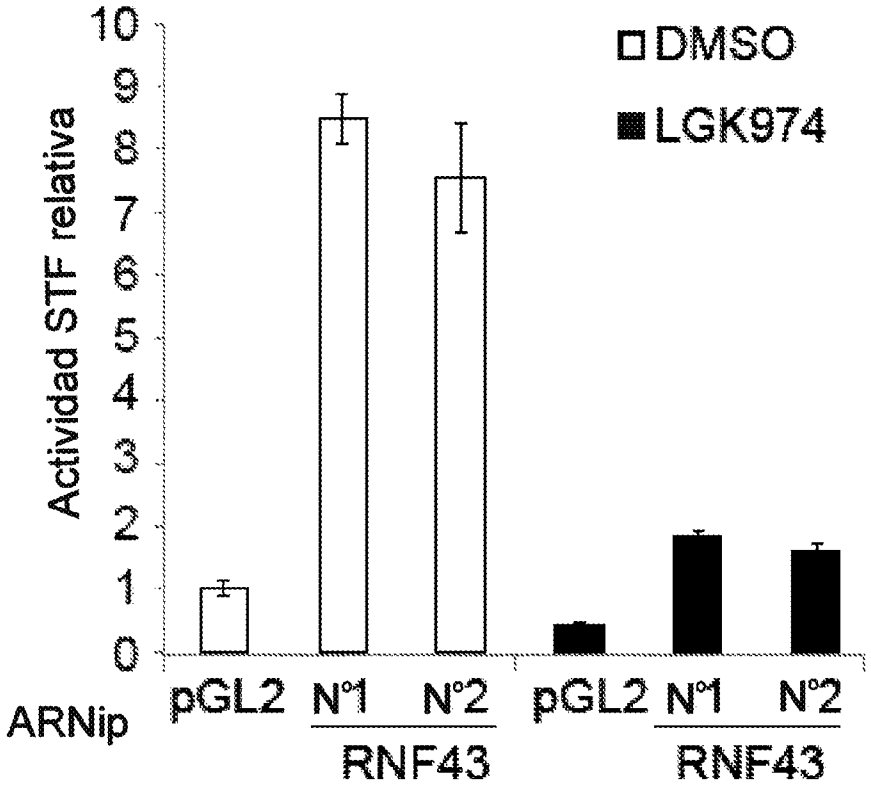

Actividad STF relativa
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
DMSO
LGK974
ARNip
pGL2
N°1
N°2
pGL2
N°1
N°2
RNF43
RNF43

FIG. 3(b)

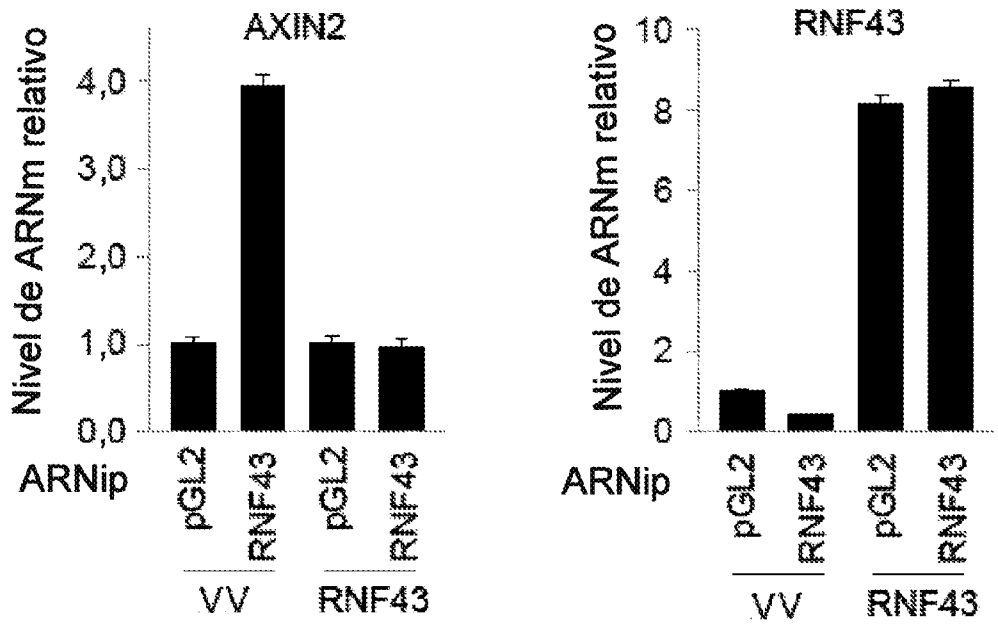

AXIN2
Nivel de ARNm relativo
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
ARNip
pGL2
RNF43
pGL2
RNF43
VV
RNF43
RNF43
Nivel de ARNm relativo
10
8
6
4
2
0
ARNip
pGL2
RNF43
pGL2
RNF43
VV
RNF43

FIG. 3(c)

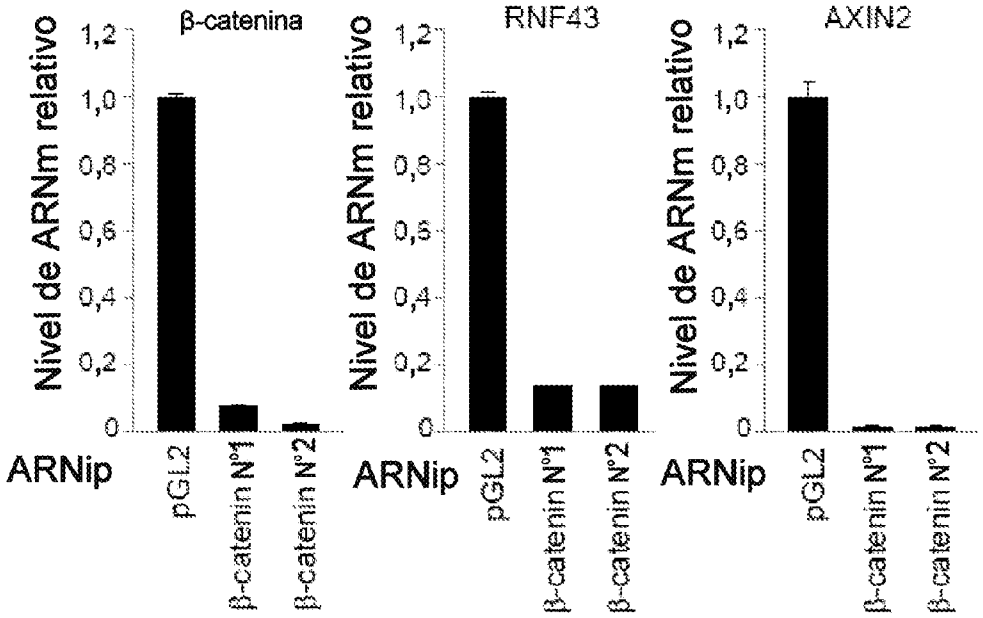

β-catenina
RNF43
AXIN2
Nivel de ARNm relativo
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
ARNip
pGL2
β-catenin N°1
β-catenin N°2

FIG. 4(a)

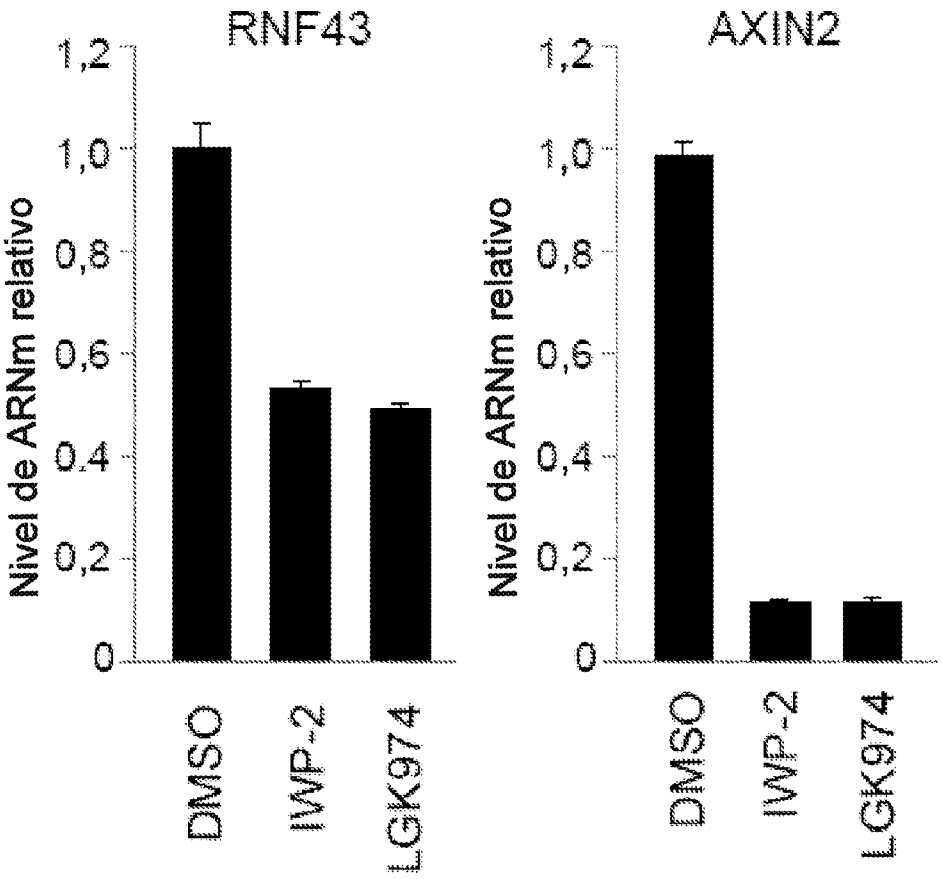

RNF43
AXIN2
Nivel de ARNm relativo
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
DMSO
IWP-2
LGK974

FIG. 4(b)