



(51) МПК
A61K 31/497 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/497 (2018.05); *A61P 35/00* (2018.05); *G01N 33/574* (2018.05); *G01N 2800/52* (2018.05); *C12Q 1/6804* (2018.05); *C12Q 1/6844* (2018.05); *C12Q 1/6858* (2018.05); *C12Q 1/686* (2018.05); *C12Q 1/6874* (2018.05); *C12Q 1/6881* (2018.05); *C12Q 1/6886* (2018.05); *C12Q 2531/113* (2018.05); *C12Q 2561/101* (2018.05); *C12Q 2561/113* (2018.05); *C12Q 2600/106* (2018.05); *C12Q 2600/158* (2018.05)

(21)(22) Заявка: 2015138688, 10.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2014

Дата регистрации:
08.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.03.2013 US 61/776,334

(43) Дата публикации заявки: 17.04.2017 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 08.08.2018 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 12.10.2015

(86) Заявка РСТ:
IB 2014/059585 (10.03.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/141038 (18.09.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры

(72) Автор(ы):

ЧЭ, Цзяньвэй (US),
ХАРРИС, Дженнифер (US),
ХСИЕХ, Хсин-и (US),
ЛИ, Цзе (US),
ЛЮ, Цзюнь (US),
НГ, Николас (US)

(73) Патентообладатель(и):
НОВАРТИС АГ (CH)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: LIU J. et al. PD08-11: Targeting
Porcupine, a Critical Node for Wnt Signalling
in Cancer. *Cancer Res* 2011; 71(24 Suppl):
Abstract nr PD08-11 [Найдено 04.09.2017] [он-
лайн]. Найдено из Интернет: URL:
[http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/
24_Supplement/PD08-11.DATABASE,
PubChem, LGK974. Compound Summary for
CID 46926973, 01.11.2010, \(см. прод.\)](http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/24_Supplement/PD08-11.DATABASE, PubChem, LGK974. Compound Summary for CID 46926973, 01.11.2010, (см. прод.))

(54) МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ИНГИБИТОРАМИ WNT

(57) Реферат:

Предложенная группа изобретений относится к области фармакогеномики. Предложены способы и набор для прогнозирования чувствительности пациента со злокачественным новообразованием к лечению ингибитором Wnt посредством измерения дифференциальной экспрессии биомаркера Notch1 в образце злокачественного новообразования. Предложено применение ингибитора Wnt 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-

2-ил)пиридин-2-ил]ацетамида или его фармацевтически приемлемой соли для лечения пациента со злокачественным новообразованием. Предложены фармацевтические композиции, содержащие указанный ингибитор. Предложенная группа изобретений обеспечивает эффективное определение чувствительности клеток к ингибиторам Wnt посредством использования специфичных биомаркеров. 9 н. и 14 з.п. ф-лы, 16 ил., 1 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

стр.1-19 [Найдено 04.09.2017] [он-лайн]. Найдено из Интернет: URL:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lgk974#section=Top>. RU 2392961 C2, 27.06.2010. WO 2009074968 A2, 18.06.2009.

R U 2 6 6 3 7 0 1 C 2

R U 2 6 6 3 7 0 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/497 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/497 (2018.05); *A61P 35/00* (2018.05); *G01N 33/574* (2018.05); *G01N 2800/52* (2018.05); *C12Q 1/6804* (2018.05); *C12Q 1/6844* (2018.05); *C12Q 1/6858* (2018.05); *C12Q 1/686* (2018.05); *C12Q 1/6874* (2018.05); *C12Q 1/6881* (2018.05); *C12Q 1/6886* (2018.05); *C12Q 2531/113* (2018.05); *C12Q 2561/101* (2018.05); *C12Q 2561/113* (2018.05); *C12Q 2600/106* (2018.05); *C12Q 2600/158* (2018.05)

(21)(22) Application: **2015138688, 10.03.2014**(24) Effective date for property rights:
10.03.2014Registration date:
08.08.2018

Priority:

(30) Convention priority:
11.03.2013 US 61/776,334(43) Application published: **17.04.2017** Bull. № 11(45) Date of publication: **08.08.2018** Bull. № 22(85) Commencement of national phase: **12.10.2015**(86) PCT application:
IB 2014/059585 (10.03.2014)(87) PCT publication:
WO 2014/141038 (18.09.2014)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**CHE, Tszyanvej (US),
KHARRIS, Dzhennifer (US),
KHSIEKH, Khsin-i (US),
LI, Tsze (US),
LYU, Tszyun (US),
NG, Nikolas (US)**

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)**(54) MARKERS ASSOCIATED WITH WNT INHIBITORS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: proposed group of inventions relates to the field of pharmacogenomics. Methods and a kit are disclosed for predicting the sensitivity of a patient with a malignant growth to treatment with a Wnt inhibitor by measuring the differential expression of a Notch1 biomarker in a sample of a malignant growth. Disclosed is the use of Wnt inhibitor 2-[5-methyl-6-(2-methylpyridin-4-yl)pyridin-3-yl]-N-[5-(pyrazin-2-yl)

pyridin-2-yl]acetamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the treatment of a patient with a malignant growth. Pharmaceutical compositions containing said inhibitor are disclosed.

EFFECT: proposed group of inventions provides effective determination of cell sensitivity to Wnt inhibitors by using specific biomarkers.

23 cl, 16 dwg, 1 tbl, 8 ex

RU 2 663 701 C 2

RU 2 663 701 C 2

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области фармакогеномики и применению биомаркеров, применимых в определении чувствительности пациента перед лечением, после ответа пациента после лечения, чувствительности злокачественного новообразования, скрининге соединений, способах лечения и фармацевтической композиции для применения в лечении.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Передача сигнала Wnt является одним из ключевых онкогенных путей во многих злокачественных новообразованиях^{1,2}. После связывания с его рецепторами, белком, родственным рецепторам липопротеинов низкой плотности, 5/6 (LRP5/6) и Frizzled (FZD) (оба являются рецепторами с одним трансмембранным участком, необходимыми для передачи сигнала Wnt), на цитоплазматической мембране лиганд Wnt запускает нарушение механизма деградации β -катенина, состоящего из аксина 2, GSK3, APC и других белков, что приводит к накоплению β -катенина в цитоплазме³. В конечном итоге, повышенные уровни β -катенина приводят к его транслокации в ядро с образованием комплекса с LEF/TCF и запускают нижележащую экспрессию генов³.

Дисрегуляция передачи сигнала¹ может происходить в результате мутаций нижележащих компонентов, таких как APC и β -катенин, что хорошо описано при раке толстого кишечника¹. Кроме того, при различных злокачественных новообразованиях зарегистрированы гиперэкспрессия лигандов Wnt или костимуляторов, таких как RSPO2/3, или сайленсинг Wnt-ингибирующих генов^{1,4}. Кроме того, мутации общих компонентов пути Wnt, таких как аксин 1/2 или корецепторов RSPO RNF43/ZNFR3, играют потенциально ключевую роль при карциноме поджелудочной железы, карциноме толстой кишки и печеночноклеточной карциноме⁴⁻⁶. При ненаправленных и направленных мутациях пути Wnt в моделях на животных наблюдали функционирование передачи онкогенного сигнала этого пути^{7,8}. В дополнение к каноническому пути Wnt, появляются данные о том, что неканоническая передача сигнала Wnt через FZD и VANGL является критической для различных аспектов образования опухоли, включая клеточную миграцию и метастазирование⁹.

Активности канонической и неканонической передачи сигнала Wnt зависят от лиганда Wnt. При биосинтезе лигандов Wnt Wnt подвергается посттрансляционному ацилированию, опосредованному поркупином (PORCN), мембраносвязанной O-ацилтрансферазой^{3,10}. PORCN является специфичным и предназначен для посттрансляционного ацилирования Wnt, необходимого для последующего секреции Wnt¹¹. Утрата PORCN приводит к ингибированию активности передачи сигнала, запускаемой лигандом Wnt, на моделях нокаутных мышей^{12,13}. У людей мутация с потерей функции (LoF) гена PORCN вызывает фокальную гипоплазию кожи, X-сцепленное доминантное нарушение, ассоциированное с множеством наследственных аномалий у гетерозигот и индивидуумов с мозаицизмом по гену PORCN. Этот фенотип согласуется с ролью пути передачи сигнала Wnt в течение эмбриогенеза и развития^{14,15}.

К настоящему времени успех терапевтического воздействия на передачу сигнала Wnt ограничен. Главным образом, это происходит из-за отсутствия эффективных терапевтических средств для мишеней в пути Wnt и отсутствия определенной популяции пациентов, которые были бы чувствительны к ингибитору Wnt. В результате различий

в сложном каскаде механизмов регуляции клеточного цикла и дифференциальной экспрессии гена различные типы злокачественных новообразований могут по-разному отвечать на одно и то же активное соединение. Данные о специфичных биомаркерах, свидетельствующие о чувствительности клеток к терапии ингибитором PORCN или ингибитором Wnt, также немногочисленны.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к анализу того, что Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT1 1, WNT10A, WNT3, WNT7A и/или DTX3L действуют как специфичные биомаркеры при определении чувствительности клеток к ингибиторам Wnt. Изобретение относится к анализу того, что по меньшей мере один из биомаркеров, выбранных из таблицы 1, представляет собой "генетическую сигнатуру" для ингибитора Wnt, обладающую повышенной точностью и специфичностью при прогнозировании того, какие злокачественные клетки или злокачественные новообразования будут чувствительными к ингибитору Wnt. С помощью способа анализируют экспрессию, экспрессию гена, мутационный статус, уровень белка или функцию по меньшей мере одного из биомаркеров, выбранных из таблицы 1, в образце злокачественного новообразования, взятого у пациента и сравниваемого с контролем, и прогнозируют чувствительность образца злокачественного новообразования к ингибитору Wnt.

Профиль изменений уровня экспрессии может свидетельствовать о благоприятном ответе или неблагоприятном ответе. Кроме того, генетическая сигнатура, выбранная из таблицы 1, имеет повышенное прогностическое значение, т.к. она также свидетельствует о том, что путь Wnt является функциональным. Изобретение также относится к примеру "персонализированной медицины", где пациентов лечат с учетом функциональной геномной сигнатуры, специфичной для этого индивидуума.

Прогностическое значение по меньшей мере одного биомаркера, представленного в настоящем описании, также можно использовать после лечения ингибитором Wnt для определения того, остается ли пациент чувствительным к лечению. После введения ингибитора Wnt биомаркеры используют для мониторинга сохраняющейся чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt. Изобретение также относится к позитивной или негативной регуляции экспрессии идентифицированных генов до и после лечения ингибитором Wnt. Это также применимо в определении того, проводят ли пациентам правильный курс лечения. Изобретение включает способ прогнозирования и мониторинга чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt. Способ включает этап введения ингибитора Wnt пациенту и измерение экспрессии гена-биомаркера в биологическом образце, взятом у пациента. Ответ пациента оценивают с учетом детекции экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1. Детекция и/или изменение уровня экспрессии по меньшей мере одного биомаркера по сравнению с контролем свидетельствует о чувствительности пациента к лечению. Профиль изменений уровня экспрессии может свидетельствовать о благоприятном ответе пациента или неблагоприятном ответе пациента.

Изобретение также относится к ингибиторам Wnt для применения в лечении рака головы и шеи. В частности, хороший терапевтический ответ прогнозируют у пациентов, в образцах злокачественных новообразований которых имеет место дифференциально негативно регулируемая экспрессия по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, по сравнению с контролем.

Аспекты, характерные черты и варианты осуществления настоящего изобретения приведены в следующих пунктах, и их можно использовать соответствующим образом

по отдельности или в комбинации:

1. Способ прогнозирования чувствительности пациента со злокачественным новообразованием к лечению ингибитором Wnt, включающий:

- а) получение образца злокачественного новообразования от пациента со злокачественным новообразованием;
- б) измерение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, в образце злокачественного новообразования, полученном от пациента; и
- в) сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена указанного биомаркера в контрольном образце;
- г) определение корреляции повышения или снижения экспрессии гена при сравнении с чувствительностью пациента к лечению ингибитором Wnt.

2. Способ лечения пациента со злокачественным новообразованием ингибитором Wnt, включающий:

- а) получение образца злокачественного новообразования от пациента со злокачественным новообразованием;
- б) измерение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, в образце злокачественного новообразования, полученном от пациента;
- в) сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена биомаркера в контрольном образце;
- г) определение чувствительности пациента к ингибитору Wnt; и
- д) введение эффективного количества ингибитора Wnt пациенту, которого определяли как чувствительного к ингибитору Wnt.

3. Способ прогнозирования чувствительности злокачественной клетки к ингибитору Wnt, включающий: а) измерение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, в клетке; б) сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, с экспрессией гена в нормальной или контрольной клетке;

- в) прогнозирование чувствительности злокачественной клетки к ингибитору Wnt на основе сравнения дифференциальной экспрессии гена.

4. Способ определения чувствительности злокачественной клетки к ингибитору Wnt, включающий:

- а) приведение злокачественной клетки в контакт по меньшей мере с одним ингибитором Wnt;
- б) измерение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, в клетке, приведенной в контакт с ингибитором Wnt;
- в) сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена биомаркера в необработанной или обработанной плацебо контрольной клетке;
- г) определение корреляции повышения или снижения экспрессии по меньшей мере одного биомаркера при сравнении с экспрессией по меньшей мере одного биомаркера в необработанной или обработанной плацебо контрольной клетке с чувствительностью злокачественной клетки к ингибитору Wnt.

5. Способ по любому из пп.1-4, где несколько биомаркеров выбраны из таблицы 1.

6. Способ по любому из пп.1-5, где биомаркер является Notch1.

7. Способ по п.6, где Notch1 содержит мутацию во внеклеточном домене.

8. Способ по любому из пп.1-7, где сравнение дифференциальной экспрессии гена

по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена в контрольном образце свидетельствует о функциональном пути Wnt.

9. Способ по любому из пп.1-8, где злокачественное новообразование является плоскоклеточной карциномой головы и шеи.

5 10. Способ по п.2 или 4, где злокачественное новообразование лечат ингибитором Wnt и наблюдают дифференциальную экспрессию аксина 2, LEF1 и/или NKD1 по сравнению с экспрессией в образце злокачественного новообразования, чувствительном к ингибитору Wnt.

11. Способ по любому из пп.1-10, где IC50 злокачественной клетки, приведенной в
10 контакт по меньшей мере с одним ингибитором Wnt, составляет менее 1 мкМ, предпочтительно менее 0,5 мкМ, более предпочтительно менее 0,2 мкМ.

12. Способ по п.11, где клетку приводят в контакт с ингибитором Wnt по меньшей мере в два разных момента времени.

13. Способ по любому из пп.4, 11 или 12, где на этапе а) клетку приводят в контакт
15 с двумя различными ингибиторами Wnt одновременно или последовательно.

14. Способ по любому из пп.4 или 11-13, где этапы b) и c) повторяют в моменты времени, выбранные из группы, состоящей из: 4 часов, 8 часов, 16 часов, 24 часов, 48 часов, 3 дней, 1 недели, 1 месяца и нескольких месяцев после введения каждой дозы ингибитора Wnt.

20 15. Ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования у пациента, где пациента выбирают на основе:

а) измерения дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, в образце злокачественного новообразования, полученного от пациента;

25 б) сравнения дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена биомаркера в контрольном образце;

с) определения чувствительности пациента к ингибитору Wnt; и

д) выбора пациента, чувствительного к ингибитору Wnt.

30 16. Ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования у пациента, имеющего дифференциальную экспрессию гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, по сравнению с экспрессией гена в контроле, где дифференциальная экспрессия гена коррелирует с тем, что пациент является чувствительным к ингибитору Wnt.

35 17. Ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования по пп.15 или 16, где несколько биомаркеров выбраны из таблицы 1.

18. Ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.15-17, где биомаркер является Notch1.

19. Ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.15-18, где Notch1 содержит мутацию во внеклеточном домене.

40 20. Ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.15-19, где злокачественное новообразование является плоскоклеточной карциномой головы и шеи, предпочтительно, образец злокачественного новообразования после лечения ингибитором Wnt демонстрирует экспрессию аксина 2, LEF1 и/или NKD1 образца злокачественного новообразования, чувствительного к
45 ингибитору Wnt.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, для применения в лечении злокачественного новообразования у пациента, где пациента выбирают на основе наблюдения экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного

из таблицы 1, в образце злокачественных клеток, полученном от указанного пациента, по сравнению с нормальным контрольным образцом клеток, где дифференциальная экспрессия гена коррелирует с тем, что пациент является чувствительным к ингибитору Wnt.

5 22. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, для применения в лечении злокачественного новообразования у пациента, демонстрирующего дифференциальную экспрессию гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, по сравнению с экспрессией гена в контроле, где дифференциальная экспрессия гена коррелирует с тем, что пациент является чувствительным к ингибитору
10 Wnt.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, для применения в лечении злокачественного новообразования по пп.21 или 22, где несколько биомаркеров выбраны из таблицы 1.

15 24. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.21-23, где биомаркер является Notch1.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.21-24, где Notch1 содержит мутацию во внеклеточном домене.

20 26. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.21-25, где злокачественное новообразование является плоскоклеточной карциномой головы и шеи.

27. Набор для прогнозирования чувствительности пациента со злокачественным новообразованием к лечению ингибитором Wnt, содержащий:

- 25 i) средства детекции экспрессии биомаркеров, выбранных из таблицы 1; и
ii) инструкции по применению указанного набора.

28. Применение набора по п.27 для любого из способов по пп.1-14.

29. Ингибитор Wnt для применения в лечении плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

30 30. Ингибитор Wnt для применения в лечении плоскоклеточной карциномы головы и шеи по п.29, где ингибитор Wnt вводят пациенту со злокачественным новообразованием, демонстрирующему дифференциальную экспрессию гена по меньшей мере одного биомаркера, выбранного из таблицы 1, по сравнению с экспрессией гена в контроле, где дифференциальная экспрессия гена коррелирует с тем, что пациент
35 является чувствительным к ингибитору Wnt.

31. Ингибитор Wnt для применения в лечении плоскоклеточной карциномы головы и шеи по п. 30, где биомаркер является Notch1.

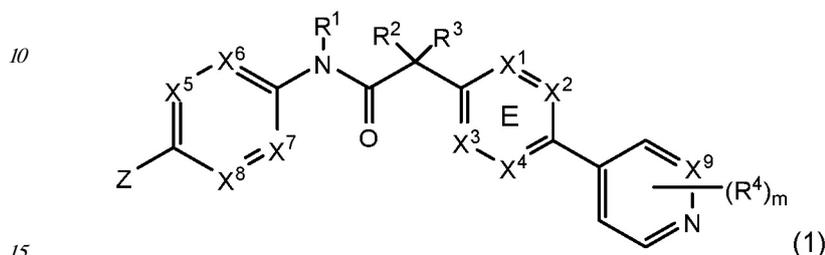
32. Способ по любому из пп.1-14, ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.15-20, фармацевтическая композиция по любому из пп.21-26 или ингибитор Wnt для применения в лечении плоскоклеточной карциномы головы и шеи по п.29, где ингибитор Wnt вводят в терапевтически эффективном количестве.

33. Ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования у пациента по любому из пп.15-20, где пациенту вводят терапевтически эффективное
45 количество ингибитора Wnt.

34. Ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования у пациента по п.33, где терапевтически эффективное количество ингибитора Wnt избирательно вводят пациенту, которого определяли как чувствительного к ингибитору

Wnt, или пациенту избирательно вводят терапевтически эффективное количество лекарственного средства, иного, чем ингибитор Wnt, на основе того, что пациент не является чувствительным к ингибитору Wnt.

35. Способ по любому из пп.1-14, ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.15-20, 33 или 34, фармацевтическая композиция по любому из пп.21-26, набор по п. 27 или ингибитор Wnt для применения в лечении плоскоклеточной карциномы головы и шеи по любому из пп.29-32, где ингибитор Wnt является соединением формулы (1):



или его физиологически приемлемой солью, где:

где X^1 , X^2 , X^3 и X^4 выбран из N и CR^7 ;

один из X^5 , X^6 , X^7 и X^8 является N, а другие являются CH;

20 X^9 выбран из N и CH;

Z выбран из фенила, пиранила, пиридина, пиридазина и пиперазина; где каждый фенил, пиранил, пиридин, пиридазин или пиперазин Z необязательно замещен R^6 -группой; R^1 , R^2 и R^3 представляют собой водород;

25 m является 1;

R^4 выбран из водорода, галогена, дифторметила, трифторметила и метила;

R^6 выбран из водорода, галогена и $-C(O)R^{10}$; где R^{10} является метилом; и

R^7 выбран из водорода, галогена, цианогруппы, метила и трифторметила.

30 36. Способ по любому из пп.1-14, ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.15-20, 33 или 34, фармацевтическая композиция по любому из пп.21-26, набор по п. 27 или ингибитор Wnt для применения в лечении плоскоклеточной карциномы головы и шеи по любому из пп.29-32, где ингибитор Wnt является соединением, выбранным из группы N-[5-(3-фторфенил)пиридин-2-ил]-2-[5-метил-6-(пиридазин-4-ил)пиридин-3-ил]ацетамида;

35 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамида;

N-(2,3'-бипиридин-6'-ил)-2-(2',3-диметил-2,4'-бипиридин-5-ил)ацетамида;

40 N-(5-(4-ацетилпиперазин-1-ил)пиридин-2-ил)-2-(2'-метил-3-(трифторметил)-2,4'-бипиридин-5-ил)ацетамида;

N-(5-(4-ацетилпиперазин-1-ил)пиридин-2-ил)-2-(2'-фтор-3-метил-2,4'-бипиридин-5-ил)ацетамида; и

2-(2'-фтор-3-метил-2,4'-бипиридин-5-ил)-N-(5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил)ацетамида; или их фармацевтически приемлемой соли.

45 37. Способ по любому из пп.1-14, ингибитор Wnt для применения в лечении злокачественного новообразования по любому из пп.15-20, 33 или 34, фармацевтическая композиция по любому из пп.21-26, набор по п.27 или ингибитор Wnt для применения в лечении плоскоклеточной карциномы головы и шеи по любому из пп.29-32, где ингибитор Wnt является 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-

2-ил)пиридин-2-ил]ацетамидом.

38. Любой из пп.1-37, где экспрессия или экспрессия гена является экспрессией ДНК, количеством копий ДНК, экспрессией мРНК, экспрессией кДНК, транскрипцией белка, экспрессией белка, модификацией ДНК, модификацией кДНК, модификацией мРНК, модификацией белка, функцией ДНК, функцией кДНК, функцией мРНК, функцией белка, мутацией ДНК, мутацией кДНК, мутацией мРНК, мутацией белка или их комбинациями; предпочтительно является мутацией ДНК.

39. Любой из пп.1-38, где биомаркер выбран из группы Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3, WNT7A и DTX3L.

40. Любой из пп.1-38, где биомаркер выбран из группы Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3, WNT7A и DTX3L.

41. Любой из пп.1-38, где биомаркер выбран из группы Notch1, Notch2, Notch3, SFRP2, FRZB, SFRP4 и DKK2.

42. Любой из пп.1-38, где биомаркер выбран из группы Notch1, Notch2 и Notch3.

43. Любой из пп.1-38, где биомаркер является Notch1.

44. Любой из пп.1-38, где биомаркер выбран из группы Notch1, Notch2, Notch3, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3 и WNT7A.

45. Любой из пп.1-38, где биомаркер является HRAS или FAT1.

46. Любой из пп.1-38, где биомаркер выбран из группы, состоящей из FAM58A, FLJ43860, NOTCH1, OR7G3, CCDC168, ZNF527 и CDKN2A.

47. Вариант осуществления любого из пп. 1-38, где биомаркер выбран из группы Notch1, Notch2, Notch3, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3, WNT7A и DTX3L, предпочтительно из группы Notch1, Notch2, Notch3, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3 и DTX3L.

48. Применение соединения, выбранного из таблицы 1, в качестве биомаркера.

49. Применение соединения, выбранного из группы Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3, WNT7A и DTX3L, в качестве биомаркера.

50. Применение соединения, выбранного из группы Notch1, Notch2, Notch3, SFRP2, FRZB, SFRP4 и DKK2, в качестве биомаркера.

51. Применение соединения, выбранного из группы Notch1, Notch2 и Notch3, в качестве биомаркера.

52. Применение соединения Notch1 в качестве биомаркера.

53. Применение соединения, выбранного из группы Notch1, Notch2, Notch3, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3 и WNT7A, в качестве биомаркера.

54. Применение соединения, выбранного из группы Notch1, Notch2, Notch3, AXIN2, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4, DKK2, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3, WNT7A и DTX3L, в качестве биомаркера.

55. Применение соединения HRAS или FAT1 в качестве биомаркера.

56. Применение соединения, выбранного из группы, состоящей из FAM58A, FLJ43860, NOTCH1, OR7G3, CCDC168, ZNF527 и CDKN2A в качестве биомаркера.

57. Применение соединения, выбранного из группы Notch1, Notch2, Notch3, FAM58A,

FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3, WNT11, WNT10A, WNT3, WNT7A и DTX3L, предпочтительно из группы Notch1, Notch2, Notch3, FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, HRAS, FAT1, OR7G3 и DTX3L, в качестве биомаркера.

58. Применение соединения по любому из пп.48-57, где применение свидетельствует о чувствительности пациента со злокачественным новообразованием к лечению ингибитором Wnt.

59. Любой из пп.39-42, 44-51 или 53-58, где по меньшей мере два биомаркера, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре биомаркера используют совместно для определения чувствительности пациента со злокачественным новообразованием к лечению ингибитором Wnt.

60. Любой из пп.1-59, где

- экспрессия WNT11, WNT10A, WNT3 или WNT7A в образце от пациента является более высокой по сравнению с контролем, указанная экспрессия свидетельствует о чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt;

15 - экспрессия AXIN2, LEF1 или NKD1 в образце от пациента после лечения снижается по сравнению с контролем до лечения, указанная экспрессия свидетельствует о чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt;

20 - снижается экспрессия Notch1, Notch2 или Notch3, в частности, активность или функция снижена/повышена в образце от пациента по сравнению с контролем, указанная экспрессия, в частности, снижение активности или функции, свидетельствует о чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt;

- экспрессия SFRP2, FRZB, SFRP4 или DKK2 в образце от пациента является более низкой по сравнению с контролем, указанная экспрессия свидетельствует о чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt;

25 - экспрессия FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, FAT1, OR7G3 или DTX3L является более низкой, в частности, потеря функции является более высокой в образце от пациента по сравнению с контролем, указанная экспрессия, в частности, потеря функции, свидетельствует о чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt;

30 - экспрессия HRAS является более высокой, в частности, приобретением функции, в образце от пациента по сравнению с контролем, и свидетельствует о чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt.

61. П.60, где ингибитор Wnt определен в любом из пп.35-37.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

35 На фигуре 1А представлена структура СОЕДИНЕНИЯ А. На фигуре 1В представлена структура СОЕДИНЕНИЯ В.

40 На фигуре 2А представлено связывание ³H-меченого соединения В с PORCN. За специфичное взаимодействие СОЕДИНЕНИЯ В и PORCN может конкурировать немеченое СОЕДИНЕНИЕ В (фигура 2А). На фигуре 2В представлено связывание СОЕДИНЕНИЯ А с PORCN.

На фигуре 3А представлено мощное ингибирование СОЕДИНЕНИЕМ А передачи сигнала Wnt в анализе Wnt посредством совместного культивирования с IC50 0,4 нМ. На фигуре 3В показано, что ингибиторный эффект восстанавливали добавлением кондиционированной среды с экзогенным Wnt3А.

45 На фигуре 4 показан эффект различных доз СОЕДИНЕНИЯ А по отношению к клеткам 293А, трансфицированным с использованием НА-Wnt3А. Как показано на фигуре 4, СОЕДИНЕНИЕ А мощно снижает избыток НА-Wnt3А в супернатанте, одновременно не действуя на лизат НА-Wnt3А, что позволяет предполагать, что

секрецию Wnt3A, по существу, ингибировали СОЕДИНЕНИЕМ А дозозависимым образом.

На фигуре 5А показано, что СОЕДИНЕНИЕ А, фактически, сильно блокирует Wnt-зависимое фосфорилирование LRP6 в аутокринных клетках L-Wnt3A, линии клеток молочной железы мыши, гиперэкспрессирующих Wnt3A. На фигуре 5В показано, что остатки вокруг предполагаемого участка пальмитоилирования Wnt, Ser209, являются консервативными среди всех 19 Wnt. На фигуре 5С показано, что СОЕДИНЕНИЕ А демонстрировало сравнимую ингибиторную активность по отношению ко всем тестируемым Wnt, включая Wnt1, 2, 3, 3А, 6, 7А и 9А.

Фигура 6. Ответ различных клеточных линий по типу злокачественного новообразования на обработку СОЕДИНЕНИЕМ А. Отвечающую клеточную линию определяют как достигающую более чем 50% снижения мРНК AXIN2 после обработки 10-100 нМ СОЕДИНЕНИЯ А в течение 48 часов. Как показано на фигуре 6, линии клеток рака головы и шеи (HNSCC) находятся среди типов злокачественных новообразований, наиболее отвечающих на СОЕДИНЕНИЕ А.

На фигуре 7 показано, что среди клеточных линий HNSCC 31 из 96 демонстрировала ингибирование пути Wnt после обработки СОЕДИНЕНИЕМ А.

На фигуре 8А показано, что СОЕДИНЕНИЕ А мощно ингибировало Wnt-зависимую продукцию AXIN2 в HN30 с IC50 0,3 нМ. На фигуре 8В показано, что СОЕДИНЕНИЕ А сильно снижало колониюобразование HN30, хотя и со сдвинутым вправо IC50.

На фигуре 9А показано, что эффект снижения колониюобразования СОЕДИНЕНИЕМ А можно частично восстанавливать посредством гиперэкспрессии доминантного β-катенина. На фигуре 9В представлено подтверждение того, что клеточный эффект СОЕДИНЕНИЯ А соответствовал ингибированию PORCN-зависимой передачи сигнала Wnt; shRNA против PORCN, по существу, ингибировала экспрессию гена-мишени Wnt AXIN2. На фигуре 9С показано, что shRNA против PORCN также ингибировала колониюобразование клеток HN30 *in vitro*.

На фигуре 10 представлена противоопухолевая активность СОЕДИНЕНИЯ А *in vivo*; т.е. на модели подкожного ксенотрансплантата HNSCC HN30 мыши. При введении дозы один раз в сутки СОЕДИНЕНИЕ А индуцировало дозозависимую эффективность и снижало массу опухоли (фигура 10А). После однократной дозы СОЕДИНЕНИЯ А 3 мг/кг уровни экспрессии мРНК AXIN2 в опухолях снижались на ~60-95% в течение 5-10 часов после введения дозы (фигура 10В). Кроме того, как показано на фигуре 10С, уровни pLRP6 в опухолях HN30, по существу, снижались в зависимости от времени.

Фигура 11. Лучшие онкогены или гены опухолевых супрессоров, имеющие мутации, в наборе клеточных линий HNSCC.

Фигура 12. Лучшие гены-кандидаты, мутации с потерей функции которых в совокупности наилучшим образом коррелировали с данными об ответе PD на СОЕДИНЕНИЕ А, из клеточных линий HNSCC.

На фигуре 13А и фигуре 13В показаны часто встречающиеся мутации с потерей функции (LoF) Notch1 в отвечающих на СОЕДИНЕНИЕ А клеточных линиях рака головы и шеи. А) Диаграммы потенциальных мутаций LoF Notch1 в клеточных линиях рака головы и шеи. N: N-конец; C: C-конец; LNR: повтор Lin12-Notch; TMD: трансмембранный домен; PEST: домен, богатый пролином, глутаминовой кислотой, серином, треонином (PEST). Мутации со сдвигом рамки считывания (fs) и нонсенс-мутации (X) включают E488fs, A495fs, K538fs, G192X, P460fs, E216X и выделены красным цветом. В) Список мутации со сдвигом рамки считывания и нонсенс-мутаций Notch1 в клеточных линиях рака головы и шеи. С) C478F Notch1 демонстрировала полное

снижение активности по сравнению с диким типом при анализе репортерного гена Notch1 со стимуляцией DLL1 или без нее.

На фигуре 14 представлена эффективность СОЕДИНЕНИЯ А in vivo. В модели ксенотрансплантата мыши SNU1076 СОЕДИНЕНИЕ А в дозе 5 мг/кг значительно снижало рост опухоли (Т/С: 25%) через 14 дней после введения (фигура 14А). СОЕДИНЕНИЕ А по существу ингибировало путь Wnt, на что указывает 70% снижение AXIN2 (фигура 14В).

На фигуре 15 представлены мутации FAT1 в клеточных линиях рака головы и шеи. Мутации FAT1 повышены в отвечающих на СОЕДИНЕНИЕ А клеточных линиях рака головы и шеи.

На фигуре 16 представлены мутации HRAS в клеточных линиях рака головы и шеи. Мутации HRAS повышены в отвечающих на СОЕДИНЕНИЕ А клеточных линиях рака головы и шеи.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Определения

Как применяют в описании и формуле изобретения, единственное число включает ссылки на множественное число, если контекст четко не указывает на иное. Например, термин "клетка" включает множество клеток, включая их смеси.

Все численные обозначения, например, рН, температура, время, концентрация и молекулярная масса, включая диапазоны, являются приближениями, варьирующимися (+) или (-) с шагом 0,1. Следует понимать, хотя это и не всегда явно указано, что всем численным обозначениям предшествует термин "приблизительно". Также следует понимать, хотя это и не всегда явно указано, что реагенты, представленные в настоящем описании, являются исключительно примерами, и что в этой области известны их эквиваленты.

В настоящем описании термины "маркер" или "биомаркер" используют взаимозаменяемо. Биомаркер является нуклеиновой кислотой или полипептидом и наличием, отсутствием или дифференциальной экспрессией нуклеиновой кислоты или полипептида, параметром, с помощью которого описывают количество генов, мутацию, функцию или активность гена или белка, и его используют для определения чувствительности к любому ингибитору Wnt. Например, Notch1 является биомаркером, и экспрессия мРНК Notch1 в образце злокачественных клеток снижается по сравнению с экспрессией Notch1 в нормальной (неопухоловой) ткани или контрольной ткани.

Термин "PORCN" относится к поркупину, мембраносвязанной ацилтрансферазе, необходимой для посттрансляционной модификации Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, PORCN относится к PORCN человека под регистрационными номерами NM_017617.3/NP_060087 (4851/P46531.4).

Термин "Notch1" относится к гомологу Notch 1. Он является рецептором с одним трансмембранным доменом в пути передачи сигнала Notch. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, Notch1 относится к Notch1 человека под регистрационными номерами NM_017617.3/NP_060087/GI:148833508 (4851/P46531.4).

Термин "Notch2" относится к нейрогенному локусу, гомологу 2 белка notch, рецептору с одним трансмембранным доменом в пути передачи сигнала Notch. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, Notch2 относится к Notch2

человека по регистрационными номерами NM_024408.3/NP_077719/GI:24041035 (4853/Q04721.3). Термин "Notch3" относится к нейрогенному локусу, гомологу 3 белка notch, рецептору с одним трансмембранным доменом в пути передачи сигнала Notch. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, Notch3 относится

к Notch3 человека под регистрационными номерами NM_000435.2/NP_000426/GI:134244285 (4854/Q9UM47.2).

5 Термин "AXIN2" относится к белку 2 ингибирования AXIS. Он является цитозольным белком с важной ролью в регуляции стабильности бета-катенина. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, AXIN2 относится к AXIN2 человека под регистрационными номерами NM_004655.3/NP_004646/GI:195927059 (8313/Q9Y2T1).

10 Термин "LEF1" относится к лимфоидному энхансер-связывающему фактору-1. Он является ядерным белком, образующим комплекс с β -катенином и запускающим нижележащую экспрессию гена-мишени. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, LEF1 относится к LEF1 человека под регистрационными номерами NM_016269/NP_001124185/GI:7705917 (51 176/Q9UJU2.1).

15 Термин "NKD1" относится к naked cuticle 1. Он является цитозольным белком, взаимодействующим с Disheveled. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, NKD1 относится к NKD1 человека под регистрационными номерами NM_0331 19/NPJ49110/GI:14916433 (85407/Q969G9.1).

20 Термин "SFRP2" относится к секретлируемому frizzled-родственному белку 2. Он является растворимым модулятором передачи сигнала Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, SFRP2 относится к SFRP2 человека под регистрационными номерами NM_003013.2/NP_003004/GI:48475052 (6423/Q96HF1.2).

25 Термин "FRZB" относится к frizzled-родственному белку, также растворимому модулятору передачи сигнала Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, FRZB относится к FRZB человека под регистрационными номерами NM_001463.3/NP_001454/GI:38455388 (2487/Q92765.2).

30 Термин "SFRP4" относится к секретлируемому frizzled-родственному белку 4, также растворимому модулятору передачи сигнала Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, SFRP4 относится к SFRP4 человека под регистрационными номерами NM_003014.3/NP_003005/GI:170784838 (6424/Q6FHJ7.2).

35 Термин "DKK2" относится к dickkopf-родственному белку 2, также растворимому модулятору передачи сигнала Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, DKK2 относится к DKK2 человека под регистрационными номерами NM_014421.2/NP_055236/GI:7657023 (27123/Q9UBU2.1).

40 Термин "WNT11" относится к WNT11. Он является секретлируемым белком-лигандом Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, WNT11 относится к WNT11 человека под регистрационными номерами NM_004626.2/NP_004617/GI:17017974 (7481/O96014).

45 Термин "WNT10A" относится к WNT10A, также секретлируемому белку-лиганду Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, WNT10A относится к WNT10A человека под регистрационными номерами NM_025216.2/NP_079492/GI: 16936520 (80326/Q9GZT5).

50 Термин "WNT3" относится к WNT3, также секретлируемому белку-лиганду Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, WNT3 относится к WNT3 человека под регистрационными номерами NM_030753.3/NP_110380/GI:13540477 (7473/P56703).

55 Термин "WNT7A" относится к WNT7A, также секретлируемому белку-лиганду Wnt. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, WNT7A относится к WNT7A человека под регистрационными номерами NM_004625.3/NP_004616/GI: 7505191 (7476/O00755).

Термин "FAM58A" относится к семейству со схожестью последовательностей 58, члену А. Этот ген содержит домен сворачивания циклинового бокса, может играть роль в контроле циклов деления клеточного ядра. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, FAM58A относится к FAM58A человека под

5 регистрационными номерами NM_152274.3/NP_689487/GI:196049382 (92002/Q8N1B3).

Термин "FLJ43860" относится к белку FLJ43860, неохарактеризованному белку с неизвестной функцией. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, FLJ43860 относится к FLJ43860 человека под регистрационными номерами NM_207414.2/NP_997297/GI:148727311 (389690/Q6ZUA9).

10 Термин "CDKN2A" относится к ингибитору 2A циклин-зависимых киназ, ключевому ингибитору для прохождения клеточного цикла. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, CDKN2A относится к CDKN2A человека под регистрационными номерами NM_000077.4/NP_478104/GI:4502749 (1029/P42771).

15 Термин "OR7G3" относится к обонятельному рецептору 7G3, одному из обонятельных сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR). Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, OR7G3 относится к OR7G3 человека под регистрационными номерами NM_001001958.1/NP_001001958/GI:50080201 (390883/Q8NG95).

20 Термин "DTX3L" относится к Deltex 3-подобной, убиквитиновой лигазе E3, ее гомолог у *Drosophila* Deltex является положительным регулятором передачи сигнала Notch у *Drosophila*. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, DTX3L относится к DTX3L человека под регистрационными номерами NM_138287.3/NP_612144.1/GI:19923717 (151636/Q8TDB6).

25 Термин "CCDC168" относится к содержащему биспиральные домены белку 168, является белком с биспиральными доменами. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, CCDC168 относится к CCDC168 человека под регистрационными номерами NM_001146197.1/NP_001139669.1/GI:226246553 (643677/Q8NDH2).

30 Термин "ZNF527" относится к белку 527 с цинковыми пальцами, принадлежащему к семейству белков с цинковыми пальцами. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, ZNF527 относится к ZNF527 человека под регистрационными номерами NM_032453.1/NP_115829/GI:149192840 (84503/Q8NB42).

35 Термин "HRAS" относится к гомологу вирусного онкогена саркомы крыс Harvey, являющемуся небольшим G-белком, активирующим путь MAP-киназ. Как применяют в настоящем описании, если конкретно не указано иначе, HRAS относится к HRAS человека под регистрационными номерами NM_005343.2/NM_176795.3 NM_001130442.1/NP_001123914.1/GI:47117697/GI:194363760/GI:194363761 (3265/P01112).

40 Термин "FAT1" относится к FAT1, являющемуся протокадгериновым белком, как сообщают, связывающимся с β -катенином и предотвращающим его ядерную транслокацию. Если конкретно не указано иначе, FAT1 относится к FAT1 человека под регистрационными номерами NM_005245.3/NP_005236/GI:75813622 (2195/Q14517).

45 В настоящем описании приводят только один регистрационный номер гена для любого указанного гена. Следует понимать, что в настоящее описание включают любую сплайсированную форму, ассоциированную с геном. В настоящем описании сплайсированная форма означает мРНК из одного гена, подвергнутую сплайсингу альтернативными путями, что приводит к экспрессии многочисленных вариантов белка из одного гена. Например, Notch2 имеет два варианта сплайсинга, NM_024408 и NM_001200001. Для Notch2 указан только NM_024408.

Как применяют в настоящем описании, термин "чувствительность" означает, что клетка или пациент отвечают на ингибитор Wnt в том смысле, что замедляют, останавливают, подавляют рост опухоли, инвазивность или метастазирование или достигают уменьшения размеров или регрессирования опухоли благодаря эффекту ингибитора Wnt. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка или образец от пациента имеют "чувствительность" к ингибитору Wnt, если клетка или образец от пациента отвечают на обработку с более чем 50% снижением аксина 2 (ингибированием пути Wnt), например, снижением уровней мРНК или белка аксина 2, если клетку или образец от пациента обрабатывают 10-100 нМ СОЕДИНЕНИЯ А в течение 48 часов. В конкретном варианте осуществления клетка или образец от пациента имеют "чувствительность" к ингибитору Wnt, если клетка или образец от пациента отвечают на обработку с более чем 50% снижением уровня мРНК аксина 2, если клетку или образец от пациента обрабатывают 50 нМ СОЕДИНЕНИЯ А в течение 48 часов.

Клетка является "чувствительной" или проявляет "чувствительность" к ингибированию ингибитором Wnt, если по меньшей мере один из биомаркеров, выбранных из таблицы 1, дифференциально негативно регулируется по сравнению с контролем. Альтернативно, клетка является "чувствительной" к ингибированию ингибитором Wnt, если несколько, более двух, более трех или полный набор биомаркеров дифференциально экспрессируется.

Термин "контрольная клетка" или "нормальная клетка" относится к неопухоловой ткани или клетке.

Термин "контрольная ткань" или "нормальная ткань" относится к неопухоловой ткани или клетке.

Термин "контрольный образец" или "нормальный образец" относится к неопухоловой ткани или клетке.

Как применяют в настоящем описании, термин "контрольный" означает экспрессию биомаркера в контрольной клетке, контрольной ткани или контрольном образце или параметр или численное значение, с помощью которого описывают значение, хорошо коррелирующее с экспрессией биомаркера в нормальной или здоровой клетке, т.е. экспрессией биомаркера в нормальной, неопухоловой клетке, образце или ткани.

В настоящем описании термин "внеклеточный домен" Notch1 означает область аминокислот 1-1735 Notch1.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" используют взаимозаменяемо и они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам или их аналогам. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут осуществлять любую функцию. Неограничивающие примеры полинуклеотидов являются следующими: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, EST- или SAGE-метка), экзоны, интроны, матричную РНК (мРНК), транспортную РНК, рибосомальную РНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК с любой последовательностью, выделенную РНК с любой последовательностью, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. При наличии, модификации структуры нуклеотида можно осуществлять до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов можно прерывать ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после полимеризации, например, посредством конъюгации с компонентом-меткой. Термин также относится к двух- и одноцепочечным молекулам.

Если не указано или необходимо иначе, любой вариант осуществления настоящего изобретения, являющийся полинуклеотидом, включает двухцепочечную форму и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, известных или прогнозируемых для получения двухцепочечной формы.

5 Термин "ген" относится к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере одну открытую рамку считывания (ORF), способную кодировать конкретный полипептид или белок после транскрипции и трансляции. Полинуклеотидную последовательность можно использовать для идентификации более крупных фрагментов или полноразмерных кодирующих последовательностей гена, с которыми они ассоциированы.

10 Способы выделения последовательностей более крупных фрагментов известны специалистам в этой области.

Термины "экспрессия гена", "продукт гена" или "экспрессия" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к нуклеиновым кислотам или аминокислотам (например, пептиду или полипептиду), образующимся при транскрипции

15 и трансляции гена, количеству копий ДНК биомаркера, последовательности геномной ДНК, кДНК или РНК биомаркера; экспрессии гена биомаркера, экспрессии белка биомаркера, экспрессии мРНК биомаркера; функциональному эффекту белка биомаркера; функциональному эффекту гена биомаркера, кДНК или мРНК; активности белка, кДНК, гена или мРНК или ее утрате или мутационному статусу, например,

20 мутации со сдвигом рамки считывания, делеции, транслокации, инсерции, дупликации, инверсии, функциональной мутации; или их комбинациям.

В конкретном варианте осуществления термины "экспрессия гена", "продукт гена" или "экспрессия" означают экспрессию ДНК, количество копий ДНК, экспрессию мРНК, экспрессию кДНК, транскрипцию белка, экспрессию белка, модификацию ДНК,

25 модификацию кДНК, модификацию мРНК, модификацию белка, функцию ДНК, функцию кДНК, функцию мРНК, функцию белка, мутацию ДНК, мутацию кДНК, мутацию мРНК, мутацию белка или их комбинации; предпочтительно мутацию ДНК. Модификация ДНК включает алкилирование или ацилирование ДНК. Например, метилирование является биохимическим процессом, включающим добавление метильной

30 группы к цитозиновым или адениновым нуклеотидам ДНК. Модификация мРНК включает редактирование РНК, являющееся биохимическим процессом, включающим изменение нуклеотидов после того, как их составила РНК-полимераза для образования последовательности. Модификация кДНК включает любую модификацию, осуществленную на уровне мРНК, которая будет преобразована в модификацию кДНК.

35 Модификация белка включает биохимический процесс, включающий изменение аминокислот после трансляции. Функцию белка подразумевают для белков, выполняющих задачи, определенные информацией, закодированной в генах, включая облегчение передачи сигнала, ферментативные реакции и т.д.

Термин "полипептид" используют взаимозаменяемо с термином "белок", и в широком

40 смысле он относится к соединению из двух или более субъединиц-аминокислот, аналогов аминокислот или пептидомиметиков. Субъединицы можно соединять пептидными связями. В другом варианте осуществления субъединицы можно соединять другими связями, например, сложноэфирной, простой эфирной и т.д.

Как применяют в настоящем описании, термин "аминокислота" относится к

45 природным и/или не природным или синтетическим аминокислотам, и D- и L-оптическим изомерам, аналогам аминокислот и пептидомиметикам. Пептид из трех или более аминокислот, как правило, называют олигопептидом, если пептидная цепь является короткой. Если пептидная цепь является длинной, пептид, как правило, называют

полипептидом или белком.

Термин "выделенный" означает отделенный от компонентов, клеточных и иных, с которыми полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагменты в норме ассоциированы в природе. Например, выделенный полинуклеотид отделяют от смежных 3'- и 5'-нуклеотидов, с которыми он в норме ассоциирован в нативном или природном окружении, например, в хромосоме. Как очевидно специалистам в этой области, неприродный полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагменты не требуют "выделения", в отличие от его природного эквивалента. Кроме того, "концентрированный", "разделенный" или "разбавленный" полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагменты отличимы от своих природных эквивалентов тем, что концентрация или количество молекул на объем является более высоким у "концентрированной" версии или меньшим у "разделенной" версии, чем у природного эквивалента. Полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагменты, отличающиеся от природных эквивалентов своей первичной последовательностью или, например, профилем гликозилирования, могут не присутствовать в своей выделенной форме, т.к. они отличаются от своего природного аналога своей первичной последовательностью или, альтернативно, другой характеристикой, такой как профиль гликозилирования. Таким образом, неприродный полинуклеотид предоставляют как вариант осуществления, отдельный от выделенного природного полинуклеотида. Белок, продуцируемый бактериальной клеткой, предоставляют как вариант осуществления, отдельный от природного белка, выделенного из эукариотической клетки, в которой он продуцируется в природе.

Термин "зонд" при использовании в отношении манипуляции с полинуклеотидом относится к олигонуклеотиду, предоставляемому в виде реагента для детекции мишени, потенциально присутствующей в интересующем образце, посредством гибридизации с мишенью. Как правило, зонд будет содержать метку или средства, с помощью которых можно прикреплять метку до или после реакции гибридизации. Подходящие метки включают, в качестве неограничивающих примеров, радиоактивные изотопы, флуорохромы, хемилюминесцентные соединения, красители и белки, включая ферменты.

"Праймер" является коротким полинуклеотидом, как правило, со свободной 3'-ОН-группой, связывающимся с мишенью или "матрицей", потенциально присутствующими в интересующем образце, посредством гибридизации с мишенью и после этого стимулирующим полимеризацию полинуклеотида, комплементарного мишени. "Полимеразная цепная реакция" ("ПЦР") является реакцией, с помощью которой получают идентичные копии полинуклеотида-мишени с использованием "пары праймеров" или "набора праймеров", состоящего из "3'-5'" и "5'-3'" праймера, и катализатора полимеризации, такого как ДНК-полимераза, и, как правило, термически стабильного фермента полимеразы. Способы ПЦР хорошо известны в этой области и приведены, например, в PCR: A Practical Approach, M. MacPherson et al., IRL Press at Oxford University Press (1991). Все способы получения идентичных копий полинуклеотида, такие как ПЦР или клонирование генов, собирательно обозначены в настоящем описании как "репликация". Праймер также можно использовать в качестве зонда в реакциях гибридизации, таких как Саузерн или нозерн-блоттинг (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989)).

Как применяют в настоящем описании, термин "дифференциально экспрессирующийся" означает измеряемое различие в экспрессии, в норме - по сравнению с контролем. Например, при использовании по отношению к гену, он может означать дифференциальный мутационный статус гена по сравнению с нормальным

функциональным геном дикого типа в нормальной клетке. Дифференциально мутантный ген может являться мутантным по сравнению с геном дикого типа, что вызывает потерю функции мутантного гена. Он также может относиться к дифференциальной продукции мРНК, транскрибируемой и/или транслируемой с гена, или белкового продукта, кодируемого геном. Дифференциально экспрессирующийся ген может гиперэкспрессироваться или гипозэкспрессироваться по сравнению с уровнем экспрессии в нормальной или контрольной клетке. Однако, как применяют в настоящем описании, гиперэкспрессия является повышением экспрессии гена и, как правило, является по меньшей мере 1,25-кратной, или, альтернативно, по меньшей мере 1,5-кратной, или, альтернативно, по меньшей мере 2-кратной, или альтернативно, по меньшей мере 3-кратной, или, альтернативно, по меньшей мере 4-кратной экспрессией по сравнению с экспрессией, детектируемой в соответствующей нормальной или контрольной клетке или ткани. Как применяют в настоящем описании, гипозэкспрессия является снижением экспрессии гена и, как правило, является по меньшей мере в 1,25 раза, или, альтернативно, по меньшей мере в 1,5 раза, или, альтернативно, по меньшей мере в 2 раза, или, альтернативно, по меньшей мере в 3 раза, или, альтернативно, по меньшей мере в 4 раза меньшей, чем экспрессия, детектируемая в соответствующей нормальной или контрольной клетке или ткани. Термин "дифференциально экспрессирующийся" также относится к случаям, когда экспрессия в злокачественной клетке или злокачественной ткани отличается по сравнению с экспрессией в контроле (например, контрольной клетке или нормальной ткани, например, незлокачественной клетке или ткани). Например, биомаркер дифференциально экспрессируется или дифференциально негативно регулируется, если экспрессия в образце злокачественного новообразования является по меньшей мере в 1,25 раза, или, альтернативно, по меньшей мере в 1,5 раза, или, альтернативно, по меньшей мере в 2 раза, или, альтернативно, по меньшей мере в 3 раза, или, альтернативно, по меньшей мере в 4 раза меньшей по сравнению с экспрессией в контроле.

Высокий уровень экспрессии гена может иметь место по причине гиперэкспрессии гена или повышения количества копий гена. Ген также может преобразовываться в повышенные уровни белка по причине дисрегуляции или отсутствия негативного регулятора.

Термин "кДНК" относится к комплементарной ДНК, т.е. молекулам мРНК, присутствующим в клетке или организме, преобразованным в кДНК с использованием фермента, такого как обратная транскриптаза. "Библиотека кДНК" является коллекцией всех молекул мРНК, присутствующих в клетке или организме, преобразованных в молекулы кДНК с использованием фермента обратной транскриптазы, затем встроенных в "векторы" (другие молекулы ДНК, которые могут продолжать реплицироваться после добавления чужеродной ДНК). Примеры векторов для библиотек включают бактериофаг (также известный как "фаг"), вирусы, инфицирующие бактерии, например, фаг лямбда. Затем библиотеку можно анализировать на предмет конкретной интересующей кДНК (и, таким образом, мРНК).

Например, транскрипционную активность можно анализировать, измеряя уровни матричной РНК с использованием генного чипа, такого как Affymetrix® HG-U 133-Plus-2 GeneChips. Таким образом, становится возможным высокопроизводительный количественный анализ РНК большого количества интересующих генов в реальном времени в воспроизводимой системе.

Термины "жесткие условия гибридизации" относятся к условиям, в которых зонд нуклеиновой кислоты будет специфически гибридизоваться со своей

подпоследовательностью-мишенью, но не с другими последовательностями. Условия, определяющие жесткость гибридизации, включают: температуру, ионную силу и концентрацию денатурирующих средств, таких как формамид. Изменение одного из этих факторов может влиять на другой фактор, и специалисту в этой области будут очевидны изменения условий для поддержания желаемого уровня жесткости. Примером очень жестких условий гибридизаций является: 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия при 65-68°C или 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия и 50% формамид при 42°C (см. Sambrook выше). Примером "умеренно жесткой" гибридизации являются условия: 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия при 50-65°C или 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия и 20% формамид при 37-50°C. Умеренно строгие условия используют, когда желательным является умеренное количество несовпадений в нуклеиновой кислоте. Специалисту в этой области будет очевидно, что промывание является частью условий гибридизации. Например, условия промывания могут включать 0,2X-0,1X SSC/0,1% SDS и температуру 42-68°C, где, повышая температуру, повышают жесткость условий промывания.

При осуществлении гибридизации в антипараллельной конфигурации между двумя одноцепочечными полинуклеотидами реакцию называют "отжигом" и эти полинуклеотиды описывают как "комплементарные". Двухцепочечные полинуклеотид могут являться "комплементарными" или "гомологичными" другому полинуклеотиду, если гибридизация может происходить между одной из цепей первого полинуклеотида и второго. "Комплементарность" или "гомология" (степень, с которой один полинуклеотид комплементарен другому) измерима в терминах пропорции оснований в противоположных цепях, которые, как ожидают, будут образовывать водородные связи друг с другом согласно общепринятым правилам спаривания оснований.

Полинуклеотид или область полинуклеотида (или полипептид или область полипептида) имеет конкретную процентную долю (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) "идентичности последовательности" по отношению к другой последовательности, это означает, что при выравнивании процентная доля оснований (или аминокислот) является одинаковой при сравнении двух последовательностей. Это выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей можно определять с использованием программного обеспечения, известного в этой области, например, описываемого в Current Protocols in Molecular biology, Ausubel et al., eds., (1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1. Предпочтительно, для выравнивания используют параметры по умолчанию. Предпочтительной программой для выравнивания является BLAST с использованием параметров по умолчанию. В частности, предпочтительными программами являются BLASTN и BLASTP с использованием следующих параметров по умолчанию: генетический код = стандартный; фильтр = нет; цепи = обе; ограничение = 60; ожидание = 10; матрица = BLOSUM62; описание = 50 последовательностей; сортировать по = высокий балл; базы данных = неповторяющиеся.

В настоящем описании биомаркер включает варианты генов и гены по меньшей мере с 95% идентичностью последовательностей.

Термин "нарушения пролиферации клеток" должен включать дисрегуляцию нормальной физиологической функции, отличающуюся аномальным ростом клеток и/или делением или потерей функции. Примеры "нарушений пролиферации клеток" включают, в качестве неограничивающих примеров, гиперплазию, неоплазию, метаплазию и различные аутоиммунные нарушения, например, отличающиеся дисрегуляцией апоптоза Т-клеток.

Как применяют в настоящем описании, термины "неопластические клетки",

"неопластическое заболевание", "неоплазия", "опухоль", "опухолевые клетки", "злокачественное новообразование" и "злокачественные клетки" (используемые взаимозаменяемо) относятся к клеткам, проявляющим относительно автономный рост таким образом, что они проявляют аномальный фенотип роста, отличающийся значительной утратой контроля клеточной пролиферации (т.е. нерегулируемым делением клеток). Неопластические клетки могут являться злокачественными или доброкачественными. Метастатическая клетка или ткань означает, что клетка может инвазировать и разрушать соседние структуры организма.

Термины "рак головы и шеи" или "плоскоклеточная карцинома головы и шеи" используют взаимозаменяемо, и они относятся к злокачественному новообразованию, возникающему в области головы и шеи¹⁶. Главным образом, оно является злокачественным новообразованием полости носа, синусов, губ, рта, слюнных желез, глотки или гортани. 90 процентов случаев рака головы и шеи классифицируют как плоскоклеточную карциному головы и шеи. Она является шестым по частоте злокачественным новообразованием в мире приблизительно с 600000 случаев в год. И 5-летняя выживаемость для пациентов с HNSCC составляет приблизительно 40-50%.

Термин "супрессия роста опухоли" относится к снижению роста опухолевых клеток, которое можно оценивать любыми способами, известными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, измерение размера опухоли, определение пролиферации опухолевых клеток с использованием анализа встраивания ³H-тимидина, измерение захвата глюкозы с помощью визуализации FDG-PET (позитронно-эмиссионной томографии с фтордезоксиглюкозой) или подсчет опухолевых клеток. "Супрессия" роста опухолевых клеток означает какое-либо или все из следующих состояний: замедление, задержку и остановку роста опухоли, а также уменьшение размеров опухоли.

"Фармацевтическая композиция" является комбинацией активного средства и другого носителя, например, соединения или композиции, инертных (например, детектируемого средства или метки) или активных, таких как адъювант, дилуент, связывающее средство, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант или т.п. Носители также включают фармацевтические эксципиенты и добавки, например: белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды и олигосахариды; дериватизированные сахара, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т.п.; и полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать в отдельности или в комбинации, составляя в отдельности или в комбинации 1-99,99% массы или объема. Углеводные эксципиенты включают, например; моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, такие как рафиноза, мелицитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактитол, ксилит, сорбит (глюцит) и миоинозитол.

Примеры белковых эксципиентов включают сывороточный альбумин, такой как сывороточный альбумин человека (HSA), рекомбинантный альбумин человек (rHA), желатин, казеин и т.п. Типичные аминокислотные/антительные компоненты, которые также могут функционировать в буферной емкости, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т.п.

Термин "носитель" дополнительно включает буфер или pH-регулирующее средство; как правило, буфер является солью, получаемой из органической кислоты или основания. Типичные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной

кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; Трис, трометамин гидрохлорид, или фосфатный буфер. Дополнительные носители включают полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерные сахар), декстраны (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил-квартура-циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные средства, подсластители, антиоксиданты, антистатические средства, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как TWEEN20™ и TWEEN 80™), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие средства (например, ЭДТА).

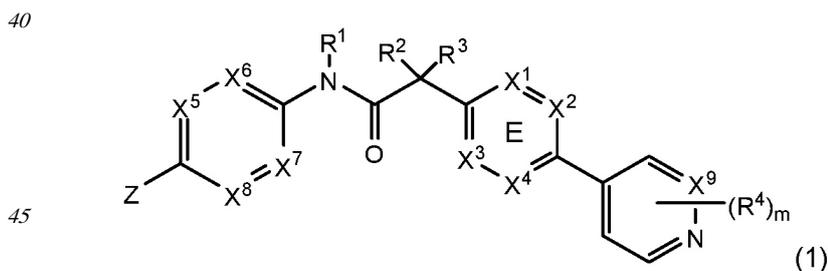
Как применяют в настоящем описании, термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой из стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатно-солевой буфер, вода и эмульсии, такие как эмульсия масло/вода или вода/масло, и различные типы увлажнителей. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты и любой из указанных выше носителей с дополнительным условием, что они являются приемлемыми для применения *in vivo*. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см. в Remington's Pharmaceutical Science., 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton (1975) и Physician's Desk Reference, 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

"Эффективное количество" является количеством, достаточным для получения благоприятных или желаемых результатов в чувствительной клетке или образце от пациента, например, предотвращения роста опухоли. Оно также может означать количество, ингибирующее путь Wnt. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений, нанесений или доз.

Термины "индивидуум" или "пациент" в настоящем описании используют взаимозаменяемо, и они означают человека, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. Млекопитающие включают, в качестве неограничивающих примеров, мышей, обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и домашних животных.

Как применяют в настоящем описании, "ингибитор Wnt" снижает активность пути Wnt. Ингибиторами Wnt являются соединения, которые могут ингибировать пути передачи сигнала Wnt, и включают ингибиторы PORCN. Это ингибирование может включать, например, ингибирование PORCN и его пальмитоилирование Wnt или снижение ассоциации между компонентами пути Wnt, включая Frizzled и Dishevelled. Предпочтительно, ингибитор Wnt является ингибитором PORCN.

В конкретном варианте осуществления ингибитор Wnt, используемый для лечения, представленного в настоящем описании, является любым подходящим соединением, описываемым в WO2010/101849 A1 (PCT/US10/025813), предпочтительно - соединением формулы (1):



или его физиологически приемлемой солью, где:

где X^1 , X^2 , X^3 и X^4 выбран из N и CR^7 ;

один из X^5 , X^6 , X^7 и X^8 является N, и другие являются CH;

X^9 выбран из N и CH;

5 Z выбран из фенила, пиразинила, пиридинила, пиридазинила и пиперазинила; где каждый фенил, пиразинил, пиридинил, пиридазинил или пиперазинил из Z необязательно замещен R^6 -группой;

R^1 , R^2 и R^3 представляют собой водород;

10 m является 1;

R^4 выбран из водорода, галогена, дифторметила, трифторметила и метила;

R^6 выбран из водорода, галогена и $-C(O)R^{10}$; где R^{10} является метилом; и

R^7 выбран из водорода, галогена, цианогруппы, метила и трифторметила.

15 В частности, ингибитор Wnt может являться соединением, выбранным из группы N-[5-(3-фторфенил)пиридин-2-ил]-2-[5-метил-6-(пиридазин-4-ил)пиридин-3-ил]ацетамида; 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамида;

N-(2,3'-бипиридин-6'-ил)-2-(2',3-диметил-2,4'-бипиридин-5-ил)ацетамида;

20 N-(5-(4-ацетилпиперазин-1-ил)пиридин-2-ил)-2-(2'-метил-3-(трифторметил)-2,4'-бипиридин-5-ил)ацетамида;

N-(5-(4-ацетилпиперазин-1-ил)пиридин-2-ил)-2-(2'-фтор-3-метил-2,4'-бипиридин-5-ил)ацетамида; и

2-2'-фтор-3-метил-2,4'-бипиридин-5-ил)-N-(5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил)ацетамида;

25 или их фармацевтически приемлемых солей.

В отдельном варианте осуществления ингибитор Wnt является 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамидом (соединением A).

30 Дополнительный ингибитор Wnt, описываемый в WO2011/123785 (PCT/US2011/030950) или WO2011/088123 (PCT/US2011/020994), можно использовать по настоящему изобретению.

Подробное описание изобретения

К настоящему времени идентифицирован ряд генов, которые могут служить в качестве биомаркера для ингибитора Wnt. Они приведены в таблице 1. Эти биомаркеры можно 35 использовать для определения чувствительности пациентов со злокачественными новообразованиями к ингибитору, и они помогают мониторировать ответ этих пациентов, которым вводят терапевтическое средство. Кроме того, четко определенные биомаркеры могут свидетельствовать о том, какому пациенту необходимо вводить терапевтическое средство, т.е. их можно использовать для стратификации пациентов 40 и повышения шансов того, что соединение, в конечном итоге, будет вызывать ответ у пациента. Они делают возможным более своевременное и агрессивное лечение в противоположность методу проб и ошибок. Биомаркеры также можно использовать для мониторинга эффективности лечения. Если биомаркеры свидетельствуют о том, что пациент стал нечувствительным к лечению, то можно повышать, снижать, полностью 45 отменять вводимую дозу или вводить дополнительное терапевтическое средство. Например, идентифицированные биомаркеры, т.е. любой биомаркер, выбранный из таблицы 1, является подходящим биомаркером, ассоциированным с ингибиторами Wnt или ингибиторами PORCN. Подход с использованием биомаркеров обеспечивает то, что подходящим пациентам проводят соответствующее лечение, и в течение курса

лечения пациента можно подвергать мониторингу на сохраняющуюся чувствительность к ингибитору Wnt, в частности, ингибитору PORCN. В способе лечения пациента со злокачественным новообразованием можно избирательно подвергать лечению в зависимости от его чувствительности к ингибитору Wnt. Биомаркеры идентифицировали, проводя эксперименты на клеточных линиях и ксенотрансплантатах мышей, или определяли на основе биоинформатического анализа.

Снижение экспрессии гена одного или нескольких биомаркеров, определенных в настоящем описании, можно использовать для определения чувствительности пациента к любому ингибитору Wnt, например, снижение или гиперэкспрессия биомаркера свидетельствуют о том, что пациент со злокачественным новообразованием является чувствительным и будет благоприятно отвечать на введение ингибитора Wnt, в частности, соединения А. В качестве другого примера, после лечения ингибитором Wnt можно получать образец от пациента и анализировать на чувствительность для определения того, является ли пациент все еще чувствительным к лечению ингибитором Wnt. Альтернативно, для получения результата можно анализировать комбинацию нескольких биомаркеров, выбранных из таблицы 1. Лечение ингибитором Wnt, в частности, определенным в настоящем описании, особенно соединением А, может являться селективным. Это означает, что ингибитор Wnt вводят только тем пациентам, которых идентифицировали как чувствительных или как тех, которые вероятно будут отвечать на лечение ингибитором Wnt. Необязательно, другим пациентам можно проводить альтернативное лечение другим лекарственным средством.

Определяли, что колебания экспрессии гена указанных биомаркеров, включая потерю или приобретение активности или функции, в образце от пациента до лечения или после лечения по сравнению с контрольным образцом могут свидетельствовать о том, что пациент отвечает на лечение ингибитором Wnt. Например, ингибитор Wnt может являться соединением А. Более конкретно, более высокая экспрессия WNT11, WNT10A, WNT3, WNT7A в образце от пациента по сравнению с контролем свидетельствует о вероятной чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt. С другой стороны, о вероятной чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt свидетельствует сниженная экспрессия AXIN2, LEF1, NKD1 по сравнению с экспрессией в контроле. Если экспрессия Notch1, Notch2 или Notch3 снижена, или, в частности, если их активность или функция снижена по сравнению с контролем, это свидетельствует о вероятной чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt. Указанную активность или функцию может вызывать мутация. Детекция более низкой экспрессии SFRP2, FRZB, SFRP4 или DKK2 в образце от пациента по сравнению с контролем может свидетельствовать о чувствительности пациента к лечению ингибитором Wnt. Более низкая экспрессия FAM58A, FLJ43860, CDKN2A, CCDC168, ZNF527, FAT1, OR7G3 или DTX3L, в частности, потеря их функции, по сравнению с контрольными уровнями, может свидетельствовать о том, что пациенты, вероятно, будут отвечать на лечение ингибитором Wnt. Если в образце от пациента наблюдают более высокую экспрессию HRAS, в частности, приобретение функции, по сравнению с контролем, чувствительность пациента к лечению ингибитором Wnt является более вероятной.

Показано, что злокачественные клетки головы и шеи являются очень чувствительными к ингибиторам Wnt. Пациенты со злокачественными новообразованиями, имеющие рак головы и шеи, могут извлечь пользу из лечения ингибитором Wnt. В основном, соединения по изобретению будут вводить в терапевтически эффективных количествах любым из общепринятых и приемлемых способов, известных в этой области, в отдельности или в комбинации с одним или

несколькими терапевтическими средствами. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в широких пределах в зависимости от тяжести заболевания, возраста и относительного состояния здоровья индивидуума, активности используемого соединения и других факторов. В основном, показано, что удовлетворительные
5 результаты систематически получают при суточной дозе от приблизительно 0,03 до 2,5 мг/кг массы тела. Указанная суточная доза у более крупного млекопитающего, например, людей, находится в диапазоне от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 100 мг, удобно вводимых, например, в дробных дозах до четырех раз в сутки. Подходящие стандартные лекарственные формы для перорального введения содержат
10 приблизительно от 1 до 50 мг активного ингредиента.

В частности, пациенты, имеющие рак головы и шеи и дифференциально негативно регулирующую экспрессию биомаркера, выбранного из таблицы 1, по сравнению с контролем могут извлекать пользу из лечения ингибитором Wnt, предпочтительно
15 СОЕДИНЕНИЕМ А. Шанс того, что такой пациент будет отвечать, является наиболее высоким. Аналогично, также можно лечить пациента, страдающего другим типом опухоли, при условии, что в его образце злокачественного новообразования дифференциальная экспрессия биомаркера, выбранного из таблицы 1, негативно регулируется по сравнению с контролем. После начала лечения ингибитором Wnt можно мониторировать эффективность ингибитора, сравнивая дифференциальную
20 экспрессию аксина 2, LEF1 и/или NKD1 с экспрессией в образце злокачественного новообразования, чувствительного к ингибитору Wnt. В норме, экспрессия аксина 2, LEF1 и/или NKD1 становится негативно регулируемой, если ингибитор Wnt является эффективным. Недостаточно негативно регулируемая экспрессия аксина 2, LEF1 и/или NKD1 свидетельствует о необходимости коррекции дозы, или может потребоваться
25 комбинирование ингибитора Wnt с другим противоопухолевым средством.

Измерение экспрессии гена

Детекцию экспрессии гена можно осуществлять любым подходящим способом, включая, например, детекцию количества мРНК, транскрибируемой с гена, или
30 количества кДНК, получаемой при обратной транскрипции мРНК, транскрибируемой с гена, или количества полипептида или белка, кодируемого геном. Эти способы можно осуществлять с помощью последовательной выборочной оценки или модифицировать для высокопроизводительного анализа. Например, с использованием микрочипов Affymetrix™ U133.

В одном из аспектов, экспрессию гена определяют и количественно анализируют с
35 помощью гибридизации с зондом, специфически гибридизующимся с подходящим зондом для этого биомаркера. Зонды также можно прикреплять к твердой подложке для использования в высокопроизводительных способах скрининга с использованием известных в этой области способов. Например, в WO 97/10365 и патентах США №№ 5405783, 5412087 и 5445934 описывают конструирование олигонуклеотидных чипов
40 высокой плотности, которые могут содержать одну или несколько последовательностей, представленных в настоящем описании. Используя способы, описываемые в патентах США №№ 5405783, 5412087 и 5445934, зонды по настоящему изобретению синтезируют на дериватизированной стеклянной поверхности. Фосфорамидиты нуклеозидов с фотозащитой присоединяют к стеклянной поверхности, избирательно лишенной защиты
45 посредством фотолиза с помощью фотолитографической маски, и проводят реакцию со вторым защищенным фосфорамидитом нуклеозидом. Присоединение/снятие защиты повторяют до получения желаемого зонда.

В одном из аспектов уровень экспрессии гена определяют, подвергая образец

нуклеиновой кислоты воздействию чипа, модифицированного с помощью зонда. Выделенную нуклеиновую кислоту метят, например, флуоресцентной меткой, предпочтительно в течение этапа амплификации. Гибридизацию меченого образца осуществляют при подходящем уровне жесткости. Степень гибридизации зонда и нуклеиновой кислоты количественно определяют с использованием устройства для детекции. См. патенты США №№ 5578832 и 5631734.

Альтернативно, что-либо из количества копий гена, транскрипции или трансляции можно определять с использованием известных способов. Например, можно использовать способ амплификации, такой как ПЦР. Общая методология ПЦР приведена в MacPherson et al., PCR: A Practical Approach, (IRL Press at Oxford University Press (1991)). Однако, условия ПЦР, используемые для каждой реакции амплификации, определяют эмпирически. Ряд параметров влияет на успех реакции. Среди них температура и время отжига, время элонгации, концентрация Mg^{2+} и/или АТФ, pH и относительная концентрация праймеров, матриц и дезоксирибонуклеотидов. После амплификации полученные фрагменты ДНК можно определять с помощью электрофореза в агарозном геле с последующей визуализации посредством окрашивания бромистым этидием и облучения ультрафиолетом.

В одном из вариантов осуществления гибридные нуклеиновые кислоты определяют посредством детекции одной или нескольких меток, прикрепленных к нуклеиновым кислотам в образце. Метки можно встраивать любым из ряда способов, хорошо известных специалистам в этой области. Однако в одном из аспектов метку встраивают одновременно на этапе амплификации при получении нуклеиновой кислоты в образце. Таким образом, например, при полимеразной цепной реакции (ПЦР) с мечеными праймерами или мечеными нуклеотидами будут получать меченый продукт амплификации. В отдельном варианте осуществления при амплификации с транскрипцией, как описано выше, с использованием меченого нуклеотида (например, меченого флуоресцеином УТР и/или СТР) встраивают метку в транскрибируемые нуклеиновые кислоты.

Альтернативно, метку можно добавлять непосредственно в исходный образец нуклеиновой кислоты (например, мРНК, полиА, мРНК, кДНК и т.д.) или к продукту амплификации после завершения амплификации. Способы прикрепления меток к нуклеиновым кислотам хорошо известны специалистам в этой области и включают, например, ник-трансляцию или введение концевой метки (например, с использованием меченой РНК) посредством обработки нуклеиновой кислоты киназой и последующего прикрепления (лигирования) линкера нуклеиновой кислоты, с помощью которого соединяют нуклеиновую кислоту в образце с меткой (например, флуорофором).

Детектируемые метки, пригодные для использования в настоящем изобретении, включают любую композицию, детектируемую спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, электрическими, оптическими или химическими способами. Подходящие метки в настоящем изобретении включают биотин для окрашивания меченым конъюгатом стрептавидина, магнитные частицы (например, Dynabeads™), флуоресцентные красители (например, флуоресцеин, тexasский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок и т.п.), радиоактивные метки (например, 3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P), ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и другие ферменты, общепотребительные в ELISA) и калориметрические метки, такие как коллоидное золото или цветное стекло или пластиковые частицы (например, из полистирола, полипропилена, латекса и т.д.). Патенты, в которых приведено

использование таких меток, включают патенты США №№ 3817837; 3850752; 3939350; 3996345; 4277437; 4275149 и 4366241.

Детекция меток хорошо известна специалистам в этой области. Таким образом, например, радиоактивные метки можно определять с использованием фотопленки или
5 сцинтилляционных счётчиков, флуоресцентные маркеры можно определять с использованием фотодатчика для детекции излучаемого света. Ферментативные метки, как правило, определяют, обеспечивая фермент субстратом и определяя продукт реакции, получаемый в результате действия фермента на субстрат, и калориметрические метки определяют просто посредством визуального наблюдения за цветной меткой.

Детектируемую метку можно добавлять к целевым нуклеиновым кислотам (в образце) до или после гибридизации, как описано в WO 97/10365. Эти детектируемые метки напрямую присоединяют или встраивают в целевую нуклеиновую кислоту (в образце) до гибридизации. В отличие от этого, "непрямые метки" присоединяют к гибриднему
10 дуплексу после гибридизации. Как правило, непрямую метку прикрепляют к связывающему остатку, прикрепленному к целевой нуклеиновой кислоте до гибридизации. Например, целевую нуклеиновую кислоту можно биотинилировать до гибридизации. После гибридизации конъюгированный с авидином флуорофор будет связываться с гибридными дуплексами, несущими биотин, образуя легко определяемую метку. Подробный обзор способов мечения нуклеиновых кислот и детекции меченых
20 гибридизованных нуклеиновых кислот см. в *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: Hybridization with Nucleic Acid Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Детекция полипептидов

Уровень экспрессии биомаркера также можно определять, исследуя экспрессию
25 белка или белковый продукт по меньшей мере одного из биомаркеров, выбранных из таблицы 1.

Определение уровня белка включает измерение степени любого иммуноспецифического связывания, происходящего между антителом, избирательно распознающим и связывающимся с полипептидом биомаркера в образце, полученном
30 от пациента, и ее сравнение со степенью иммуноспецифического связывания по меньшей мере одного биомаркера в контрольном образце. Степень экспрессии белка биомаркера может являться повышенной или пониженной по сравнению с экспрессией в контроле. Альтернативно, можно оценивать комбинацию нескольких биомаркеров, выбранных из таблицы 1.

В этой области доступно множество способов анализа белка. Они включают, в качестве неограничивающих примеров, радиоиммунологические анализы, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), иммунологические анализы "сэндвич"-
35 типа, иммунорадиометрические анализы, иммунологические анализы *in situ* (с использованием, например, коллоидного золота, ферментативных или радиоизотопных меток), анализ вестерн-блоттинга, анализы иммунопреципитации, иммунофлуоресцентные анализы, проточную цитометрию, иммуногистохимию, конфокальную микроскопию, ферментативные анализы, поверхностный плазмонный резонанс и электрофорез в ПААГ в присутствии SDS.

Анализ на биомаркеры и лечение ингибитором Wnt

После прогнозирования того, что пациент будет чувствительным к ингибитору Wnt, можно осуществлять введение пациенту любого ингибитора Wnt в одной дозе
45 непрерывно или периодически на всем протяжении курса лечения. Способы определения наиболее эффективных способов и дозировок для введения хорошо известны

специалистам в этой области и будут варьироваться в зависимости от композиции, используемой для терапии, цели терапии, клетки-мишени, подвергаемой воздействию, и индивидуума, подвергаемого лечению. Можно осуществлять однократное или

5 Подходящие лекарственные составы и способы введения средств можно корректировать эмпирически.

После введения ингибитора Wnt можно оценивать по меньшей мере один из биомаркеров, выбранных из таблицы 1, для определения того, остается ли пациент чувствительным к лечению ингибитором Wnt. Кроме того, по меньшей мере один
10 биомаркер можно оценивать во многие моменты времени после однократного введения ингибитора. Например, вводят начальный болюс ингибитора Wnt, оценивают по меньшей мере один биомаркер через 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 8 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 3 дня, 1 неделю или 1 месяц или несколько месяцев после первого лечения. Альтернативно, несколько, например 2, 3, 4, 5 или все биомаркеры, выбранные из
15 таблицы 1, можно оценивать совместно.

По меньшей мере один биомаркер, выбранный из таблицы 1, можно оценивать после каждого введения ингибитора Wnt, таким образом, что, если осуществляют многократное введение ингибиторов Wnt, то по меньшей мере один биомаркер можно
20 оценивать после каждого введения для определения длительной чувствительности пациента. Пациента можно подвергать многократным введениям ингибитора Wnt, а затем оценивать биомаркеры в различные моменты времени. Например, курс лечения может потребовать введения начальной дозы ингибитора Wnt, второй дозы через определенный период времени, и еще третьей дозы через часы после второй дозы. По
25 меньшей мере один биомаркер можно оценивать через 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 8 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 3 дня, 1 неделю или 1 месяц или несколько месяцев после введения каждой дозы ингибитора Wnt. Альтернативно, несколько, например, 2, 3, 4, 5 или все из биомаркеров, выбранных из таблицы 1, можно оценивать совместно.

Также в объем изобретения входит то, что различные биомаркеры оценивают в различные моменты времени. Не будучи связанными какой-либо теорией, по причине
30 механизма действия ингибитора Wnt или биомаркера ответ на ингибитор Wnt является замедленным, и по меньшей мере один биомаркер оценивают в любое время после введения для определения того, остается ли пациент чувствительным к введению лекарственного средства. Анализ по меньшей мере на один биомаркер, выбранный из
35 таблицы 1, после каждого введения ингибитора Wnt будет служить руководством в отношении способов, дозировки и курса лечения.

В конечном итоге, осуществляют введение различных ингибиторов Wnt с последующим анализом по меньшей мере на один биомаркер, выбранный из таблицы 1. В этом варианте осуществления выбирают несколько ингибиторов Wnt и вводят их
40 пациенту. Затем по меньшей мере один биомаркер, выбранный из таблицы 1, можно оценивать после введения каждого разного ингибитора Wnt. Как указано выше, этот анализ также можно осуществлять во множество моментов времени после введения различных ингибиторов Wnt. Например, можно вводить пациенту первый ингибитор Wnt и оценивать по меньшей мере один биомаркер через 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 8
45 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 3 дня, 1 неделю или 1 месяц или несколько месяцев после введения. Затем можно вводить второй ингибитор и оценивать по меньшей мере один биомаркер через 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 8 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 3 дня, 1 неделю или 1 месяц или несколько месяцев после введения второго ингибитора Wnt. Альтернативно, несколько, например, 2, 3, 4, 5 или все из биомаркеров, выбранных

из таблицы 1, можно оценивать совместно.

Другой аспект изобретения относится к способу оценки подходящих уровней дозы ингибитора Wnt, включающему мониторинг дифференциальной экспрессии по меньшей мере одного из биомаркеров после введения ингибитора Wnt. Например, после введения первого болюса ингибитора Wnt анализируют по меньшей мере один биомаркер и, с учетом этого результата, рекомендуют повышение или снижение дозировки ингибитора Wnt. После введения скорректированной дозы ингибитора Wnt с помощью анализа по меньшей мере одного биомаркера будут определять, является ли пациент все еще чувствительным к скорректированной дозе, и что скорректированная доза обеспечивает ожидаемый благоприятный эффект, например, супрессию роста опухоли. Альтернативно, несколько, например, 2, 3, 4, 5 или все из биомаркеров, выбранных из таблицы 1, можно оценивать совместно для оценки чувствительности к дозе ингибитора Wnt.

Альтернативно всем вариантам осуществления, для оценки длительной эффективности ингибитора Wnt в исходно чувствительной опухоли можно сравнивать дифференциальную экспрессию NKD1, LEF1 и/или аксина 2 с экспрессией в чувствительном образце опухоли. Чувствительный образец опухоли также определяют как опухоль, демонстрирующую более чем 50% снижение аксина 2 (ингибирование пути Wnt) при обработке 50 нМ соединения А в течение 48 часов.

Можно получать наборы для оценки активности любого ингибитора Wnt. Например, для оценки чувствительности к ингибитору Wnt можно использовать набор, содержащий праймеры нуклеиновой кислоты для ПЦР или для гибридизации на микрочипах для биомаркеров, выбранных из таблицы 1. Альтернативно, набор, дополненный антителами по меньшей мере к одному из биомаркеров, будет полезен в анализе чувствительности к ингибитору Wnt.

В этой области хорошо известно, что злокачественные новообразования могут становиться резистентными к химиотерапии, особенно когда лечение является длительным. Анализ на дифференциальную экспрессию по меньшей мере одного из биомаркеров, выбранных из таблицы 1, можно осуществлять после длительного лечения любым химиотерапевтическим средством для определения того, является ли злокачественное новообразование чувствительным к ингибитору Wnt. Если пациента ранее лечили другим химиотерапевтическим средством или другим ингибитором Wnt, полезную информацию для пациента можно получать при анализе по меньшей мере одного из биомаркеров, выбранных из таблицы 1, для определения того, является ли опухоль чувствительной к ингибитору Wnt. Этот анализ может являться особенно полезным для пациента, если злокачественное новообразование входит в стадию ремиссии, а затем вновь растет или метастазирует в другое место.

Скрининг на ингибиторы Wnt

Можно проводить анализ по меньшей мере на один биомаркер, выбранный из таблицы 1 для скрининга на другой ингибитор Wnt. Этот способ включает анализ клетки с использованием по меньшей мере одного биомаркера, с помощью чего прогнозируют, является ли клетка чувствительной к предполагаемому ингибитору Wnt, затем клетку приводят в контакт с предполагаемым ингибитором Wnt и IC50 обработанной клетки сравнивают с известным ингибитором Wnt, приведенным в контакт с чувствительной клеткой. Например, для клеток, по прогнозам чувствительных к любому ингибитору Wnt, как определяют по дифференциальной экспрессии по меньшей мере одного биомаркера, предполагаемый ингибитор Wnt будет иметь $IC_{50} \leq 3$ мкМ. Измерение экспрессии по меньшей мере одного биомаркера можно осуществлять описываемыми выше способами, например, ПЦР или анализом с помощью микрочипов. Альтернативно,

для этих целей можно оценивать комбинацию нескольких биомаркеров.

ТАБЛИЦА 1

Название гена (соединение)	Регистрационный номер доступа	SEQ ID NO. (нуклеотид/ белок)
Notch1	NM_017617.3/NP_060087/GI:148833508	4851/P46531
Notch2	NM_024408.3/NP_077719/GI:24041035	4853/Q04721
Notch3	NM_000435.2/NP_000426/GI:134244285	4854/Q9UM47
AXIN2	NM_004655.3/NP_004646/GI:195927059	8313/Q9Y2T1
LEF1	NM_016269/NP_001124185/GI:7705917	51176/Q9UJU2
NKD1	NM_033119/NP_149110/GI:14916433	85407/Q969G9
SFRP2	NM_003013.2 /NP_003004/GI:48475052	6423/Q96HF1
FRZB	NM_001463.3/NP_001454/GI:38455388	2487/Q92765
SFRP4	NM_003014.3/NP_003005/GI:170784838	6424/Q6FHJ7
DKK2	NM_014421.2/NP_055236/GI:7657023	27123/Q9UBU2
FAM58A	NM_152274.3/NP_689487/GI:196049382	92002/Q8N1B3
FLJ43860	NM_207414.2/NP_997297/GI:148727311	389690/Q6ZUA9
OR7G3	NM_001001958.1/NP_001001958/GI:50080201	390883/Q8NG95
CCDC168	NM_001146197.1/NP_001139669.1/GI:226246553	643677/Q8NDH2
ZNF527	NM_032453.1/NP_115829/GI:149192840	84503/Q8NB42
CDKN2A	NM_000077.4/NP_478104/GI:4502749	1029/P42771
OR7G3	NM_001001958.1/NP_001001958/GI:50080201	390883/Q8NG95
WNT11	NM_004626.2/NP_004617/GI:17017974	7481/O96014
WNT10A	NM_025216.2/NP_079492/GI:16936520	80326/Q9GZT5
WNT3	NM_030753.3/NP_110380/GI:13540477	7473/P56703
WNT7A	NM_004625.3/NP_004616/GI:17505191	7476/O00755
DTX3L	NM_138287.3/NP_612144.1/GI:19923717	151636/Q8TDB6
HRAS	NM_005343.2/ NM_176795.3 NM_001130442.1/NP_001123914.1/GI:47117697/GI:194363760/GI:194363761	3265/P01112
FAT1	NM_005245.3/NP_005236/GI:75813622	2195/Q14517

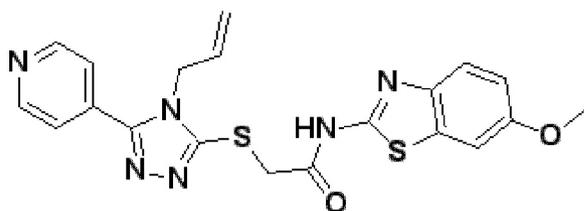
ПРИМЕРЫ

Пример 1: СОЕДИНЕНИЕ А и СОЕДИНЕНИЕ В (фигура 1А и 1В, соответственно) являются мощными ингибиторами PORCN в биохимических и клеточных анализах

Радиолигандный анализ: Получение мембраны: Приблизительно 10^8 клеток 293 трансфицировали с помощью конструкций pcDNA 3.1 (Invitrogen), несущих PORCN человека, с использованием Fugene 6 (Roche). Через 48 часов собирали клетки, соскребая их в PBS, центрифугировали при $1000 \times g$ в течение 10 минут. Отсасывали буфер.

Клеточные осадки замораживали в бане с сухим льдом, затем осторожно ресуспендировали в 10 мл буфера 50 мМ Трис pH 7,5, 250 мМ сахарозы, содержащем смесь ингибиторов протеаз без ЭДТА (Sigma). Клетки лизировали с использованием Polytron (Brinkman). Лизированные клетки центрифугировали при $1600 \times g$ в течение 20 минут при $4^\circ C$ и супернатант переносили и центрифугировали при 20000 об/мин в роторе SS34 в течение 20 минут при $4^\circ C$. Удаляли супернатанты и ресуспендировали осадки в растворе 10% сахарозы, 50 мМ Трис, pH 7,5, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА с помощью трех 10-секундных импульсов с использованием Polytron.

Мечение СОЕДИНЕНИЯ В радиолигандом: Соединение С, его структура приведена ниже,



метили радиоактивным изотопом с помощью реакции гидрирования, осуществляемой AmBioslabs, для получения ^3H -радиоактивно меченного СОЕДИНЕНИЯ В.

Радиолигандный анализ: Используя указанные выше препараты мембран, фильтрационный анализ связывания осуществляли следующим образом. Для снижения неспецифического связывания 96-луночные фильтрационные планшеты (PerkinElmer) заранее покрывали 0,1% BSA по инструкциям производителя, а затем четыре раза промывали 0,1% BSA. Препараты мембран (50 мкг общего белка) инкубировали в полипропиленовых 96-луночных планшетах с 6,6 нМ ^3H -соединением В в присутствии или отсутствие СОЕДИНЕНИЯ А в буфере (50 мМ Трис, рН 7,5, 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭДТА, 0,1% бычьего сывороточного альбумина) со смесью ингибиторов протеаз без ЭДТА (Sigma) в конечном объеме 150 мкл в течение 3 часов при комнатной температуре. Затем смеси для реакции связывания переносили в предварительно покрытые 96-луночные фильтрационные планшеты (PerkinElmer), фильтровали и промывали с использованием 96-pin FilterMate Harvester (PerkinElmer). Радиоактивные сигналы получали с использованием сцинтилляционного счётчика для микропланшетов, TopCount (PerkinElmer). Активности связывания радиолиганда с PORCN измеряли с помощью TopCount (PerkinElmer). Построение кривой осуществляли с использованием Prism.

Как показано на фигуре 2А, меченное тритием СОЕДИНЕНИЕ В сильно связывалось с препаратами мембран из клеток 293, трансфицированных с использованием PORCN, но не с препаратами клеток без Wnt или клеток, трансфицированных с использованием контрольного вектора, что указывает на то, что СОЕДИНЕНИЕ В специфически взаимодействует с PORCN. Кроме того, со специфическим взаимодействием между СОЕДИНЕНИЕМ В и PORCN может конкурировать немеченое СОЕДИНЕНИЕ В (фигура 2А). СОЕДИНЕНИЕ В связывалось с PORCN и служило в качестве активного радиолиганда в биохимическом анализе связывания PORCN *in vitro* на конкуренцию с неактивными тестовыми соединениями. В радиолигандном анализе на PORCN с использованием ^3H -СОЕДИНЕНИЯ В СОЕДИНЕНИЕ А демонстрировало IC_{50} 1 нМ (фигура 2В).

Пример 2: Ингибирование PORCN СОЕДИНЕНИЕМ А блокирует передачу сигнала Wnt *in vitro*

Анализ репортерного гена: Клетки Лейдига мыши ТМ3 (полученные в American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) культивируют в смеси 1:1 среды Хэма F12 и модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), дополненной 2,5% FBS (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) и 5% лошадиной сыворотки (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), при 37°C с 5% CO_2 в атмосфере воздуха. Клетки ТМ3 в чашке размером 10 см котрансфицировали с использованием 8 мкг STF-репортерной плазмиды, содержащей ген люциферазы, запускаемый Wnt-чувствительными элементами, и 2 мкг pcDNA3.1-Neo (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) с 30 мкл FuGENE6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) по инструкциям производителя. Стабильные клеточные линии (ТМ3

Wnt-Luc) подвергали селекции с использованием 400 мкг/мл G418 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA). Клетки TM3 Wnt-Luc и L-клетки Wnt3A (полученные в American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), дополненной 10% FBS (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) и 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), при 37°C с 5% CO₂ в атмосфере воздуха, трипсинизировали и совместно культивировали в 384-луночном планшете со средой DMEM, дополненной 2% FBS, и обрабатывали различными концентрациями соединения по изобретению. Через 24 часа анализируют активность люциферазы светлячка с использованием системы для анализа люциферазы Bright-Glo™ (Promega, Madison, WI). Измеряют IC₅₀, когда эффект соединения снижает сигнал люминесценции на 50%.

СОЕДИНЕНИЕ А мощно ингибировало передачу сигнала Wnt в анализе совместного культивирования Wnt с IC₅₀ 0,4 нМ (фигура 3А). Этот ингибиторный эффект восстанавливали добавлением кондиционированной среды с экзогенным Wnt3A (фигура 3В). Для дополнительного подтверждения его функции в PORCN-зависимой секреции Wnt клетки 293А трансфицировали с использованием НА-меченного Wnt3а (НА-Wnt3А) и обрабатывали различными дозами СОЕДИНЕНИЯ А. Как показано на фигуре 4, СОЕДИНЕНИЕ А мощно ослабляло избыток НА-Wnt3А в супернатанте, одновременно не действуя на лизат НА-Wnt3А, что позволяет предполагать, что секреция Wnt3А, по существу, ингибирована СОЕДИНЕНИЕМ А дозозависимым образом. Затем секретируемые Wnt функционировали в отношении Wnt-чувствительных клеток, что приводило к фосфорилированию ко-репортера Wnt LRP6. Используя аутокринные клетки L-Wnt3А, линию клеток молочной железы мыши, гиперэкспрессирующую Wnt3А, авторы настоящего изобретения показали, что СОЕДИНЕНИЕ А фактически значительно блокировало Wnt-зависимое фосфорилирование LRP6 (белка, родственного рецепторам липопротеинов низкой плотности б) (фигура 5А). Сообщают, что PORCN влияет на посттрансляционное пальмитоилирование всех Wnt^{17,18}. Остатки вокруг предполагаемого участка пальмитоилирования Wnt, Ser209, являются консервативными среди всех 19 Wnt (фигура 5В), и мотив пальмитоилирования CHGxSGSC не идентифицирован в каком-либо другом белке во всем протеоме. Для тестирования того, может ли СОЕДИНЕНИЕ А повторять последствие генетической потери PORCN, авторы настоящего изобретения фокусировались на наборе канонических Wnt в анализах Wnt-зависимого репортера STF, включая Wnt1, 2, 3, 3А, 6, 7А и 9А. Как показано на фигуре 5С, СОЕДИНЕНИЕ А демонстрировало сравнимую ингибиторную активность против всех тестируемых Wnt, что соответствует утрате фенотипа PORCN. Кроме того, СОЕДИНЕНИЕ А не демонстрировало значительной цитотоксичности в клетках в дозе до 20 мкМ.

Пример 3: Клеточные функциональные эффекты ингибитора Wnt в линиях злокачественных клеток головы и шеи человека

Для идентификации линий злокачественных клеток человека, отвечающих на ингибирование поркупина, авторы настоящего изобретения профилировали более 300 клеточных линий с использованием уровня экспрессии мРНК AXIN2 в качестве индикатора. Все клеточные линии культивировали во влажной камере при 37°C с 5% CO₂. Клетки HN30 (Wayne State University) и клетки UMSCC (University of Michigan) получали из образцов опухоли пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи человека (HNSCC). Тотальную РНК или ДНК выделяли с использованием набора Qiagen RNeasy и DNeasy blood and tissue, соответственно, по инструкциям производителя.

В кратком изложении, клетки разрушали, добавляя буфер RLT, и гомогенизировали с использованием центрифужных колонок QIAshredder. После добавления одного объема 70% этанола к гомогенизированному лизату и тщательного перемешивания образцы переносили на центрифужную колонку RNeasy. После центрифугирования удаляли элюат. После двукратной промывки центрифужных колонок RNeasy буфером RW1 и буфером RPE собирали образцы РНК, элюируя центрифужные колонки RNeasy водой без РНКаз. Для анализа TaqMan 2×10^6 клеток на лунку помещали в 6-луночные планшеты для клеточных культур и обрабатывали с использованием соединения или без него в многоточечном анализе доза-ответ, начиная с 5 мкМ в качестве наибольшей конечной концентрации. Через 48 часов собирали образцы РНК.

Отвечающую клеточную линию определяли как достигающую более чем 50% снижения мРНК AXIN2 после обработки 10-100 нМ СОЕДИНЕНИЯ А в течение 48 часов, предпочтительно после обработки 50 нМ СОЕДИНЕНИЯ А в течение 48 часов. Как показано на фигуре 6, линии клеток рака головы и шеи (HNSCC) находятся среди типов злокачественных новообразований, лучше всего отвечающих на СОЕДИНЕНИЕ А. Среди клеточных линий HNSCC, 31 из 96 демонстрировала ингибирование пути после обработки СОЕДИНЕНИЕМ А (фигура 7).

Для корреляции ингибирования пути с функционированием клеток клеточную линию HNSCC человека HN30 использовали для дальнейшего определения характеристик *in vitro* и *in vivo*. Для анализа колониеобразования 2×10^3 клеток на лунку помещали в 6-луночные планшеты для клеточных культур с обработкой соединением или без него. Через неделю клетки окрашивали кристаллвиолетом.

СОЕДИНЕНИЕ А мощно ингибировало Wnt-зависимую продукцию матричной РНК AXIN2 в HN30 с IC50 0,3 нМ (фигура 8А). Оно сильно ослабляло колониеобразование HN30, хотя и с IC50, сдвинутой вправо (фигура 8В). Эффект снижения колониеобразования СОЕДИНЕНИЕМ А можно частично восстанавливать с помощью гиперэкспрессии доминантного β -катенина (фигура 9А). Для дополнительного подтверждения того, что клеточный эффект СОЕДИНЕНИЯ А является результатом ингибирования активности PORCN-зависимой передачи сигнала Wnt, осуществляли эксперименты с shRNA. shRNA против PORCN, по существу, ингибировала экспрессию гена-мишени Wnt AXIN2 (фигура 9В) и колониеобразование клеток HN30 *in vitro* (фигура 9С), что соответствует данным о СОЕДИНЕНИИ А.

Пример 4: Эффективность ингибитора Wnt на модели Wnt-зависимой HNSCC человека у мыши

Для тестирования противоопухолевой активности СОЕДИНЕНИЯ А получали модель ксенотрансплантата HNSCC HN30 мыши. Голых мышей, несущих опухоли HN30, рандомизировали по объему опухоли. СОЕДИНЕНИЕ А составляли в 10% цитратном буфере, pH 2,8/90% цитратном буфере, pH 3,0, или 0,5% МС/0,5% Tween 80 и вводили с помощью гаважа при объеме дозы 10 мкл/г массы тела животного. Массу тела мониторируют ежедневно и оценивали размеры опухолей трижды в неделю, если опухоли являлись пальпируемыми. Размеры опухолей определяли с использованием кавернометрии. Объемы опухолей вычисляли по формуле (длина \times ширина \times высота)/2. Концентрации в плазме и воздействие СОЕДИНЕНИЯ А у голых мышей, несущих опухоли, (n=2 на исследуемую группу) определяли в день 14. Образец крови (50 мкл) собирали посредством серийного ретроорбитального забора крови через 1, 3, 7, 16 и 24 часа после введения дозы. Образцы крови центрифугировали, отделяли плазму и замораживали до проведения анализа посредством LC/MS/MS.

Как показано на фигуре 10А, СОЕДИНЕНИЕ А имело дозозависимую эффективность

при введении дозы один раз в сутки. Измеряли изменения массы опухоли для каждой из исследуемой (Т) и контрольной (С) групп и использовали для вычисления задержки роста, выражаемой как соотношение Т/С. Через 14 дней после введения доза 0,1 мг/кг приводила к умеренной задержке роста опухоли (Т/С: 69%), и доза 0,3 мг/кг значительно ингибировала рост опухоли (Т/С: 26%), и дозы 1,0 и 3,0 мг/кг приводили к существенному регрессированию опухоли (Т/С: -31% и -50% соответственно) (фигура 10А). Режим дозирования хорошо переносился, и не наблюдали значительной потери массы тела животных. Аналогичный результат получали в этой модели при введении дозы дважды в сутки с -44% Т/С при дозе 0,5 мг/кг дважды в сутки.

Уровни мРНК AXIN2 и pLRP6 (определяемые, как описано в примере 3) использовали в качестве фармакодинамических маркеров, связанных с наблюдаемой противоопухолевой активностью в модели ксенотрансплантата HN30 мыши. После однократной дозы СОЕДИНЕНИЯ А 3 мг/кг уровни экспрессии мРНК AXIN2 в опухолях снижались на ~60-95% между 5 и 10 часами после введения дозы, и эффект начинал снижаться через 16 часов вместе со снижением концентраций лекарственного средства (фигура 10В). Наблюдали задержку времени между пиковой концентрацией лекарственного средства (через 1 час) и максимальным ингибированием мРНК AXIN2 (через 10 часов). Кроме того, как показано на фигуре 10С, уровни pLRP6 в опухолях HN30, по существу, снижались в зависимости от времени. Максимального эффекта достигали через 7-10 часов после введения дозы, и уровни pLRP6, в значительной степени, возвращались к норме через 24 часа. Введение СОЕДИНЕНИЯ А также вызывало негативную регуляцию LEF1 на 84% и негативную регуляцию NKD1 на 67%. Эта взаимосвязь фармакокинетики (PK), PD и эффективности позволяет объяснить то, что длительное ингибирование пути не является необходимым для индуцирования регрессирования опухоли в этой модели ксенотрансплантата HN30, что может представлять ключевой фактор дифференцирования между опухолевыми и нормальными тканями для достижения терапевтического окна. Можно сделать вывод, что ингибитор Wnt, в частности, соединение А, можно использовать в лечении рака головы и шеи.

Пример 5: Прогнозирование чувствительности к ингибитору Wnt в модели ксенотрансплантата первичной опухоли человека у мыши и в первичных опухолях человека с помощью оценки экспрессии генов Notch1, Notch2, Notch3, LEF1, NKD1, SFRP2, FRZB, SFRP4 и DKK2:

Для исследования других связанных с Wnt генов, регулируемых введением СОЕДИНЕНИЯ А *in vivo*, использовали анализ TaqMan® GeneCard, с помощью которого выявляли понижающую регуляцию нескольких других известных генов-мишеней Wnt, включая LEF1 и NKD1, а также лиганды Wnt, включая Wnt3 и Wnt9B.

Для этого осуществляли двухэтапный анализ TaqMan RT-ПЦР с помощью термоциклера Пельтье PTC-200 (MJ Research) и системы ABI PRISM 7900HT Sequence Detection system (Applied Biosystems). Во-первых, синтезировали кДНК с использованием набора High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems) по инструкциям производителя. В кратком изложении, получали реакционную смесь для RT-ПЦР, смешивая неферментативные, ферментативные компоненты набора High-Capacity cDNA Archive и выделенные образцы РНК, с последующей последовательной инкубацией при 25°C в течение 10 мин и при 37°C в течение 120 мин с использованием термоциклера. Во-вторых, осуществляли анализы TaqMan с использованием TaqMan Universal Master mix (Applied Biosystems) и зондов AXIN2 и GAPDH (Applied Biosystems) по инструкциям производителя. В кратком изложении, получали реакционную смесь для ПЦР, смешивая Universal Master mix, зонды TaqMan и синтезированные образцы кДНК. Цикл ПЦР

являлся следующим: 95°C в течение 10 мин и 40 циклов последовательной инкубации при 95°C в течение 15 сек и при 60°C в течение 1 мин. Уровни экспрессии мРНК генов-мишеней нормировали по уровням мРНК GAPDH и анализировали данные с использованием программного обеспечения SDS 2.0 (Applied Biosystems) для вычисления относительного количества РНК. Построение кривой осуществляли с использованием Prism.

Для анализа GeneCard использовали 96-луночный генетический чип TaqMan по инструкциям производителя. Анализы с использованием генетических чипов осуществляли с использованием системы для ПЦР в реальном времени ABI 7900HT (Applied Biosystems) и анализировали с помощью способа $\Delta\Delta C_t$.

При сравнении профилей экспрессии генов в опухолях HN30 и нормальных тканях ротоглотки человека с использованием анализа GeneCard лиганды Wnt, включая Wnt3, 7A, 10A и 11, по существу, являлись гиперэкспрессированными в опухолях HN30, в то время как известные Wnt-ингибирующие гены, такие как SFRP2, FRZB, SFRP4 и DKK2, по существу, подвергались негативной регуляции, что соответствует гипотезе о том, что передача сигнала Wnt является этиологической мишенью. Эти данные свидетельствуют о том, что клеточная линия, образец злокачественного новообразования или пациент, имеющий тип злокачественного новообразования, более вероятно будет чувствительным к ингибитору Wnt, если обнаруживают, что экспрессия гена SFRP2, FRZB, SFRP4 или DKK2 дифференциально подвергается негативной регуляции по сравнению с контролем. Образец злокачественного новообразования или злокачественное новообразование, имеющее экспрессию гена SFRP2, FRZB, SFRP4 или DKK2, дифференциально подвергающуюся негативной регуляции по сравнению с контролем, более вероятно будет чувствительным к ингибитору Wnt по сравнению с образцом злокачественного новообразования или злокачественным новообразованием, проявляющим экспрессию гена, сравнимую с контролем. Эту концепцию можно использовать в стратификации пациентов, когда выбирают и подвергают лечению пациентов, которые наиболее вероятно будут отвечать на лечение ингибитором Wnt.

Для лучшего понимания механизма действия в клетках, отвечающих на введение СОЕДИНЕНИЯ А, включая клетки HN30, осуществляли секвенирование экзона на 40 клеточных линиях HNSCC с 25 отвечающими линиями и 15 неотвечающими линиями. TP53, CDKN2A, Notch 1/2/3, PTEN, HRAS и PIK3CA находились среди лучших онкогенов или генов опухолевых супрессоров, мутантных в этом наборе клеточных линий (фигура 11).

Получение полноэкзомной библиотеки и секвенирование: Конструирование экзомной библиотеки осуществляли с использованием набора для обогащения экзона Roche NimbleGen V2 (44,1 т.п.н.) (Otogenetics). Секвенирование спаренных концов (2x100 п.н.) отобранных экзонов осуществляли с помощью платформы Illumina Genome Analyzer 11x со средним покрытием 50X (Otogenetics).

Обработка данных о последовательностях: Полученные с помощью секвенирования данные обрабатывали с использованием стандартных программных инструментов, рекомендуемых Broad Institute Genome Atlas Tool Kit (GATK):

Исходные файлы секвенирования fastq с ридями и показателями качества для каждого образца подвергали выравниванию относительно NCBI human reference genome GRCh37 с использованием Burrows-Wheeler Aligner версии 0.5.9 (<http://bio-bwa.sourceforge.net>). Для каждого образца получали один отсортированный файл бинарного выравнивания/картирования (BAM) с выравниванием относительно референсного генома.

Файлы BAM после выравнивания дополнительно очищали с использованием способа

"повторного выравнивания уровня образца с известными вставками/делециями и рекалибровкой". (<http://www.broadinstitute.org/gatk/guide>)

Унифицированный genotyper GATK использовали для каждого рекалиброванного и очищенного файла BAM для получения SNP, мультинуклеотидного полиморфизма (MNP) и вставки-делеции. После определения вариантов для каждого образца их соединяли в SNP множества образцов и определяли вставки/делеции. Получали отдельные файлы Variant Call Format (VCF) для SNP и определения вставок/делеций.

Затем все сигналы вариантов обрабатывали с помощью SnpEff (v2.1b <http://snpeff.sourceforge.net/>) для прогнозирования их функциональных эффектов в отношении соответствующих белковых продуктов и с помощью аннотатора вариантов GATK для дополнительного аннотирования. Для картирования геномных изменений в известных вариантах использовали различные общедоступные базы данных, включая dbSNP v.135, COSMIC v.58 и ESP5400.

Анализ вариантов: Для снижения артефактов при секвенировании использовали различные фильтры, включая качество варианта <30 , качество картирования <30 , достоверность варианта <2 , и нормированная Phred-взвешенная вероятность >80 . Определяли всего 18349 генов, имеющих геномные изменения по сравнению с референсным экзомом. Общее количество геномных изменений во всех 40 клеточных линиях HNSCC составляет приблизительно 169 тыс. Однако, большинство из них (89%) является известными вариантами, аннотированными в общедоступных базах данных, указанных выше. Среди новых вариантов, приблизительно половина (6% от общего количества) вариантов приводит к модификации последовательности белка, такой как мутации, укорачивание, инсерции и делеции. Необходимо отметить, что все секвенирование проводили для клеточных линий, для которых недоступна совпадающая норма. Таким образом, некоторые из наблюдаемых новых вариантов потенциально могут являться SNP. Мутации, возникающие при пассажах клеточных линий, также возможны, и их нельзя отличить от мутаций, возникающих при росте и прогрессировании злокачественного новообразования. Каждая из линий UM-SCC имеет уникальные генотипы, и их использовали при наименьшем количестве пассажей, как правило, менее 100 пассажей от исходной культуры.

Функциональные эффекты геномных изменений оценивали с помощью SnpEff. Мутации с сильным эффектом включают сдвиг рамки считывания, мутации участка сплайсинга, утрату инициаторного кодона, возникновение стоп-кодона и утрату стоп-кодона. Мутации с умеренным эффектом включают инсерцию или делецию в рамке считывания и несинонимичные мутации. Потенциальную мутацию зародышевой линии определяли по тому, аннотирована ли мутация в dbSNP с происхождением SNP аллеля (SAO) <2 или в записи ESP5400, но не в COSMIC.

Для исследования корреляции мутаций с потерей функции и фармакологической функцией СОЕДИНЕНИЯ А авторы настоящего изобретения объединяли все вероятные варианты с потерей функции (LoF) в одну категорию, т.к. известно, что мутации LoF гена могут включать мутации, распространяющиеся в широких пределах белковой последовательности. Мутации включали варианты с сильным эффектом, такие как возникновение стоп-кодона, сдвиг рамки считывания, утрата инициаторного кодона и мутации участка сплайсинга. Авторы настоящего изобретения также задавали комбинированную глубину секвенирования для аллеля дикого типа и мутантного аллеля, составляющую по меньшей мере 5, для удаления вариантов с крайне низким покрытием. Используя определение вариантов у 40 клеточных линий HNSCC, подвергнутых секвенированию, авторы настоящего изобретения оценивали эффект

обогащения вариантов LoF в отношении PD ответа на СОЕДИНЕНИЕ А для каждого гена. Фактор обогащения определяли следующим образом (т.е. отношение шансов),

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

5 Где P(отвечающий|мутант) представляет собой вероятность ответа на введение СОЕДИНЕНИЯ А при условии, что ген содержит мутацию LoF, и P(отвечающий) представляет собой вероятность случайного ответа на введение СОЕДИНЕНИЯ А.

Пример 6: Notch1 является наиболее предиктивным биомаркером для лечения ингибитором Wnt

10 Гены-кандидаты выбирали с учетом $E > 2$ и количества случаев LoF более 3. Среди лучших кандидатов, Notch1 LoF имел один из наиболее высоких факторов обогащения, в 3 раза большее обогащение по сравнению со случайным отбором. Мутации/варианты Notch1 валидировали посредством секвенирования кДНК или геномной ДНК линий злокачественных клеток (GeneWiz). Последовательности анализировали с
 15 использованием Sequencher (GeneCodes).

С учетом этих данных авторы настоящего изобретения могут сделать вывод, что одной из наиболее убедительных характеристик, коррелирующих с мутационным статусом гена и ответами клеточных линий на СОЕДИНЕНИЕ А с ингибированием пути, являлась мутация Notch1 с потерей функции (LoF) в отвечающих клеточных линиях.
 20 Как показано на фигурах 13А и 13В, в отвечающих клеточных линиях идентифицировали пять мутаций со сдвигом рамки считывания/нонсенс-мутаций, но при этом только одну нонсенс-мутацию Notch1 в неответающих клеточных линиях. Примечательно, что все клетки с мутациями Notch1 имели по меньшей мере один мутантный аллель, влияющий на N-конец Notch1. Это согласуется с представлением о том, что N-конец Notch1
 25 необходим для его функционирования, при этом N-концевые EGF-повторы отвечают за взаимодействие лиганд-рецептор¹⁷, таким образом, мутации в этой области более вероятно будут мутациями LoF. Для дальнейшего исследования функционального следствия миссенс-мутаций, таких как Notch1 C478F, идентифицированных в клетках HN30, осуществляли анализ репортерного гена Notch с гиперэкспрессией варианта
 30 дикого типа или мутанта C478F (фигура 13С). Мутация C478F находится во внеклеточном домене Notch1, который, предположительно, является критичным для взаимодействия рецептора Notch и лиганда. Фактически, в этом анализе репортерного гена Notch в присутствии лиганда Notch DLL1 прекращается активность мутантного C478F Notch1 (фигура 13С).

35 Все это может служить руководством для выбора пациентов с задачей обеспечения клинического лечения ингибиторами PORCN, такими как, например, СОЕДИНЕНИЕ А.

В клеточной линии HNSCC SNU1076 идентифицировали гетерозиготную нонсенс-мутацию DTX3L (Deltex 3-подобного, также называемого ВВАР, В-лимфома- и VAL-ассоциированного белка). DTX3L является убиквитиновой лигазой E3. Его клеточная
 40 функция в пути Notch у млекопитающих неясна, но его гомолог у *Drosophila* Deltex является положительным регулятором передачи сигнала Notch у *Drosophila*. В модели ксенотрансплантата SNU1076 мыши СОЕДИНЕНИЕ А при дозе 5 мг/кг значительно ингибировало рост опухоли (Т/С: 25%) через 14 дней после введения (фигура 14А).
 45 Кроме того, СОЕДИНЕНИЕ А, по существу, ингибировало путь Wnt, на что указывает 70% снижение AXIN2 (фигура 14В). Потеря DTX3L может представлять альтернативный механизм инактивации пути передачи сигнала Notch с последующей активацией передачи сигнала Wnt.

Пример 7: HRAS и FAT1 в качестве предиктивного маркера для лечения ингибитором Wnt.

При секвенировании экзона и профилировании клеточных линий авторы настоящего изобретения наблюдали обогащение респондеров соединения А в мутантных по FAT1 линиях клеток рака головы и шеи (фигура 15). Кроме того, при анализе 4 из 5 клеточных

линий, имеющих мутации HRAS, отвечали на соединение А (фигура 16).

Пример 8: Прогнозирование химической чувствительности клеточной линии к ингибитору Wnt на основе геномных данных и клинических проявлений

Как определяли с помощью секвенирования экзона, экспрессия гена Notch1 (например, мутационный статус) является одним из наиболее мощных показателей чувствительности к ингибитору Wnt, и, таким образом, ее можно использовать в качестве биомаркера для стратификации, рассматриваемого для выбора пациентов со злокачественными новообразованиями, отвечающими на ингибитор Wnt, такой как, например, СОЕДИНЕНИЕ А. Ассоциация мутации Notch1 LoF с химической чувствительностью к ингибитору Wnt в панели линий злокачественных клеток свидетельствует о том, что Notch1 полезен в прогнозировании чувствительности пациента к ингибитору Wnt. Мутация Notch1 LoF предназначена для прогнозирования ответа с ингибированием пути на основе биоинформатического анализа 40 линий клеток рака головы и шеи (как описано выше). В дополнение к Notch1 и с учетом модели опухоли SFRP2, FRZB, SFRP4 и DKK2 также коррелировали с эффективностью ингибитора Wnt. Даже более высокую прогностическую мощь ожидают при использовании набора по меньшей мере из двух биомаркеров, представленных в настоящем описании, для прогнозирования чувствительности. С помощью биоинформатики идентифицировали дополнительный набор применимых биомаркеров, которые можно использовать для стратификации пациентов, - FAM58A, FLJ43860, NOTCH1, CDKN2A, OR7G3, CCDC168, ZNF527, HRAS и FAT1. Т.к. частота мутации Notch1 LoF является относительно высокой у пациентов HNSCC, экспрессия гена Notch1 особенно подходит для выбора пациентов с HNSCC. Ассоциация мутации Notch1 LoF с химической чувствительностью к ингибиторам Wnt в панели линий злокачественных клеток свидетельствует о том, что Notch1 имеет прогностическое значение 3-кратного обогащения по сравнению со случайным отбором. Другие указанные выше биомаркеры также ассоциированы с доклиническими моделями, чувствительными к ингибитору Wnt. В качестве экстраполяции к клиническим условиям, выбор пациентов с учетом указанных выше биомаркеров будет повышать вероятность клинического ответа после лечения ингибитором Wnt.

Ссылки

- 1 Polakis, P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, doi:10.1101/cshperspect.a008052 (2012).
- 2 Nusse, R. & Varmus, H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *The EMBO journal* 31, 2670-2684, doi:10.1038/emboj.2012.146 (2012).

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

- 3 Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205, doi:10.1016/j.cell.2012.05.012 (2012).
- 4 Seshagiri, S. *et al.* Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature* 488, 660-664, doi:10.1038/nature11282 (2012).
- 5 Hao, H. X. *et al.* ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485, 195-200, doi:10.1038/nature11019 (2012).
- 6 Koo, B. K. *et al.* Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488, 665-669, doi:10.1038/nature11308 (2012).
- 10 Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. & Birchmeier, W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes & development* 22, 2308-2341, doi:10.1101/gad.1686208 (2008).
- 15 Aoki, K. & Taketo, M. M. Tissue-specific transgenic, conditional knockout and knock-in mice of genes in the canonical Wnt signaling pathway. *Methods Mol Biol* 468, 307-331, doi:10.1007/978-1-59745-249-6_24 (2008).
- 20 Wang, Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics* 8, 2103-2109, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0282 (2009).
- 10 Herr, P., Hausmann, G. & Basler, K. WNT secretion and signalling in human disease. *Trends in molecular medicine* 18, 483-493, doi:10.1016/j.molmed.2012.06.008 (2012).
- 25 Takada, R. *et al.* Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental cell* 11, 791-801, doi:10.1016/j.devcel.2006.10.003 (2006).
- 12 Biechele, S., Cox, B. J. & Rossant, J. Porcupine homolog is required for canonical Wnt signaling and gastrulation in mouse embryos. *Developmental biology* 355, 275-285, doi:10.1016/j.ydbio.2011.04.029 (2011).
- 30 Barrott, J. J., Cash, G. M., Smith, A. P., Barrow, J. R. & Murtaugh, L. C. Deletion of mouse Porcn blocks Wnt ligand secretion and reveals an ectodermal etiology of human focal dermal hypoplasia/Goltz syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12752-12757, doi:10.1073/pnas.1006437108 (2011).
- 35 Wang, X. *et al.* Mutations in X-linked PORCN, a putative regulator of Wnt signaling, cause focal dermal hypoplasia. *Nature genetics* 39, 836-838, doi:10.1038/ng2057 (2007).
- 40 Grzeschik, K. H. *et al.* Deficiency of PORCN, a regulator of Wnt signaling, is associated with focal dermal hypoplasia. *Nature genetics* 39, 833-835, doi:10.1038/ng2052 (2007).
- 16 Leemans, C., Braakhuis, B., Brakenhoff, R., The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 11 (1), 9-22, doi: 10.1038/nrc.2010.12.16 (2011)
- 45 17 Kopan R (2012) Notch signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(10).

(57) Формула изобретения

1. Способ прогнозирования чувствительности пациента со злокачественным

новообразованием к лечению ингибитором Wnt в образце посредством использования ингибитора Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой соли, включающий:

- 5 а) получение образца злокачественного новообразования от пациента со злокачественным новообразованием;
- б) измерение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, в образце злокачественного новообразования, полученном от пациента;
- 10 в) сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена биомаркера в контрольном образце,
- д) определение корреляции сниженной экспрессии или сниженной активности или функции по сравнению с контролем с чувствительностью пациента к лечению ингибитором Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой солью.

2. Применение ингибитора Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой соли для лечения пациента со злокачественным новообразованием ингибитором Wnt, включающее:

- 20 а) получение образца злокачественного новообразования от пациента со злокачественным новообразованием
- б) измерение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, в образце злокачественного новообразования, полученном от пациента;
- 25 в) сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена биомаркера в контрольном образце,
- д) определение чувствительности пациента к ингибитору Wnt с учетом сниженной экспрессии или сниженной активности или функции по меньшей мере одного биомаркера по сравнению с контролем; и
- 30 е) введение эффективного количества ингибитора Wnt пациенту, которого определяли как чувствительного к ингибитору Wnt.

3. Применение ингибитора Wnt по п.2, где Notch1 содержит мутацию во внеклеточном домене.

4. Применение ингибитора Wnt по п.2 или 3, где сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена в контрольном образце свидетельствует о функциональном пути Wnt.

5. Применение ингибитора Wnt по п.2 или 3, где злокачественное новообразование является плоскоклеточной карциномой головы и шеи.

6. Применение ингибитора Wnt по п.2 или 3, где злокачественное новообразование лечат ингибитором Wnt и наблюдают дифференциальную экспрессию актина 2, LEF1 и/или NKD1 по сравнению с экспрессией в образце злокачественного новообразования, чувствительного к ингибитору Wnt.

7. Применение ингибитора Wnt по п.2 или 3, где экспрессия или экспрессия гена является экспрессией ДНК, количеством копий ДНК, экспрессией мРНК, экспрессией кДНК, транскрипцией белка, экспрессией белка, модификацией ДНК, модификацией кДНК, модификацией мРНК, модификацией белка, функцией ДНК, функцией кДНК, функцией мРНК, функцией белка, мутацией ДНК, мутацией кДНК, мутацией мРНК, мутацией белка или их комбинациями; предпочтительно является мутацией ДНК.

8. Способ прогнозирования чувствительности злокачественной клетки в образце с использованием ингибитора Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой соли, включающий:

- 5 а) измерение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, в клетке;
- б) сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена в нормальной или контрольной клетке;
- 10 в) прогнозирование чувствительности злокачественной клетки к ингибитору Wnt на основе сравнения дифференциальной экспрессии гена с учетом сниженной экспрессии или сниженной активности или функции по меньшей мере одного биомаркера по сравнению с контролем.

9. Способ определения чувствительности злокачественной клетки в образце к ингибитору Wnt с использованием ингибитора Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой соли, включающий:

- 15 а) приведение злокачественной клетки в контакт с ингибитором Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой солью;
- 20 б) измерение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, в клетке, приведенной в контакт с ингибитором Wnt;
- в) сравнение дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена биомаркера в необработанной или обработанной плацебо контрольной клетке;
- 25 д) определение корреляции снижения экспрессии Notch1 по сравнению с экспрессией Notch1 в необработанной или обработанной плацебо контрольной клетке с чувствительностью злокачественной клетки к ингибитору Wnt.

10. Применение ингибитора Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой соли для лечения злокачественного новообразования у пациента, где пациента выбирают на основе:

- а) измерения дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, в образце злокачественного новообразования, полученном от пациента;
 - 35 б) сравнения дифференциальной экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера с экспрессией гена биомаркера в контрольном образце;
 - в) определения чувствительности пациента к ингибитору Wnt на основе сниженной экспрессии или сниженной активности или функции по меньшей мере одного биомаркера по сравнению с контролем; и
 - 40 д) выбора пациента, чувствительного к ингибитору Wnt;
- и 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту, которого определяли как чувствительного или который, вероятно, будет отвечать на лечение ингибитором Wnt.

45 11. Применение ингибитора Wnt по п.10, где Notch1 содержит мутацию во внеклеточном домене.

12. Применение ингибитора Wnt по п.11, где злокачественное новообразование является плоскоклеточной карциномой головы и шеи, предпочтительно образец

злокачественного новообразования после лечения ингибитором Wnt демонстрирует экспрессию аксина 2, LEF1 и/или NKD1 образца злокачественного новообразования, чувствительного к ингибитору Wnt.

13. Применение ингибитора Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой соли для лечения злокачественного новообразования у пациента, имеющего дифференциальную экспрессию гена по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, по сравнению с экспрессией гена в контроле, где дифференциальная экспрессия гена коррелирует с тем, что пациента определяют как чувствительного к ингибитору Wnt, если экспрессия по меньшей мере одного маркера, являющегося Notch1, снижена, или его активность или функция снижена по сравнению с контролем.

14. Применение ингибитора Wnt по п.13, где Notch1 содержит мутацию во внеклеточном домене.

15. Применение ингибитора Wnt по п.14, где злокачественное новообразование является плоскоклеточной карциномой головы и шеи, предпочтительно образец злокачественного новообразования после лечения ингибитором Wnt демонстрирует экспрессию аксина 2, LEF1 и/или NKD1 образца злокачественного новообразования, чувствительного к ингибитору Wnt.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтическую соль, для лечения злокачественного новообразования у пациента, где пациента выбирают с учетом наблюдения экспрессии гена по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, в образце злокачественных клеток, полученного от указанного пациента, по сравнению с нормальным контрольным образцом клеток, где дифференциальная экспрессия гена коррелирует с тем, что пациента определяют как чувствительного к ингибитору Wnt, если экспрессия по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, снижена, или его активность или функция снижена по сравнению с контролем.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, по п.16, где Notch1 содержит мутацию во внеклеточном домене.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, по п.17, где злокачественное новообразование является плоскоклеточной карциномой головы и шеи.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль, для лечения злокачественного новообразования у пациента, демонстрирующего дифференциальную экспрессию гена по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, по сравнению с экспрессией гена в контроле, где дифференциальная экспрессия гена коррелирует с тем, что пациент является чувствительным к ингибитору Wnt, если экспрессия по меньшей мере одного биомаркера, являющегося Notch1, снижена, или его активность или функция снижена по сравнению с контролем.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, по п.19, где Notch1 содержит мутацию во внеклеточном домене.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор Wnt, по п.20, где злокачественное новообразование является плоскоклеточной карциномой головы и шеи.

22. Набор для прогнозирования чувствительности пациента со злокачественным

новообразованием к лечению ингибитором Wnt под названием 2-[5-метил-6-(2-метилпиридин-4-ил)пиридин-3-ил]-N-[5-(пиразин-2-ил)пиридин-2-ил]ацетамид или его фармацевтически приемлемой солью, содержащей:

- 5 i) средства детекции экспрессии биомаркера Notch1;
- ii) инструкции по применению указанного набора.

23. Набор по п.22 для применения в любом из способов по пп.1, 8 или 9.

10

15

20

25

30

35

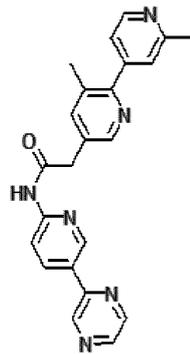
40

45

1/17

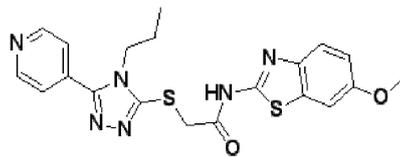
ФИГ.1

1A



СОЕДИНЕНИЕ А

1B

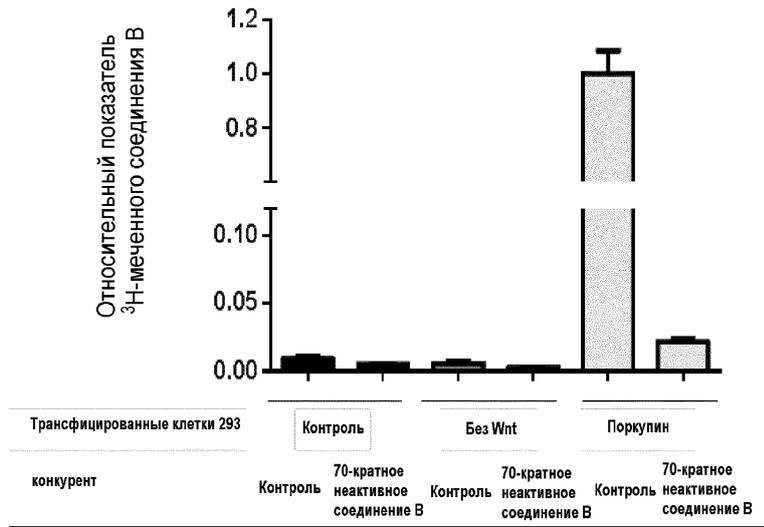


СОЕДИНЕНИЕ В

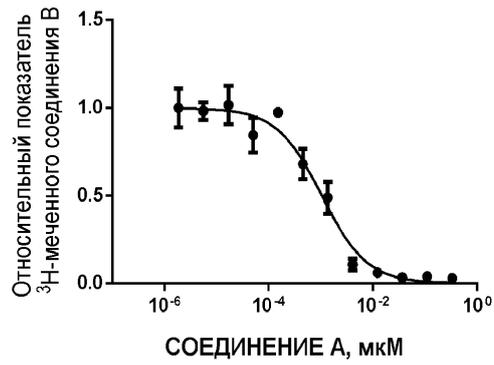
2/17

ФИГ.2

ФИГ.2А



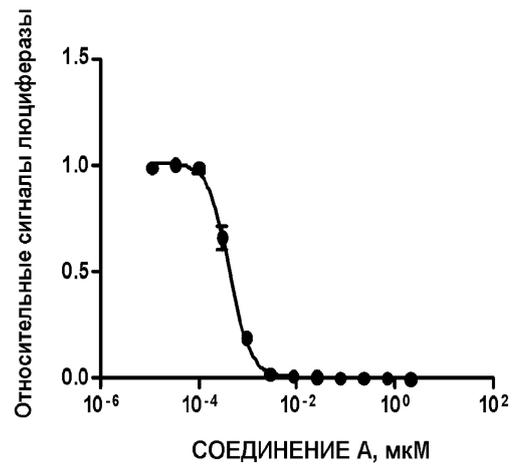
ФИГ.2В



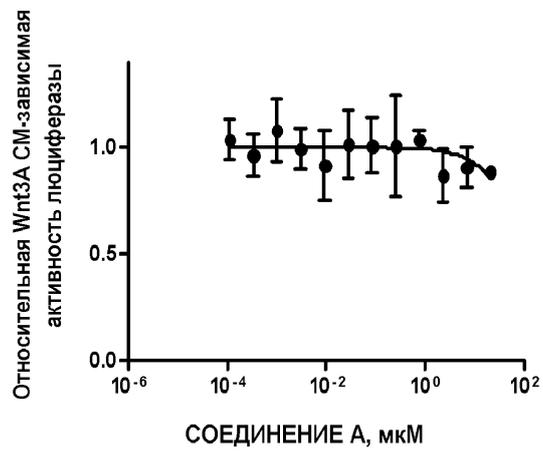
3/17

ФИГ. 3

ФИГ.3А

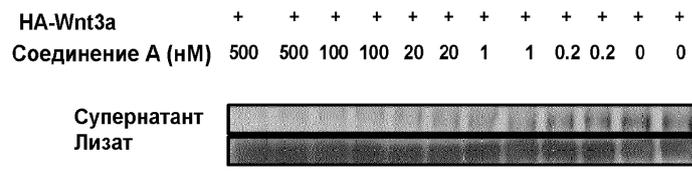


ФИГ.3В



4/17

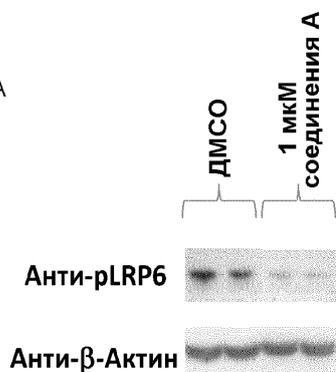
ФИГ.4



5/17

ФИГ.5

ФИГ. 5А



ФИГ.5В

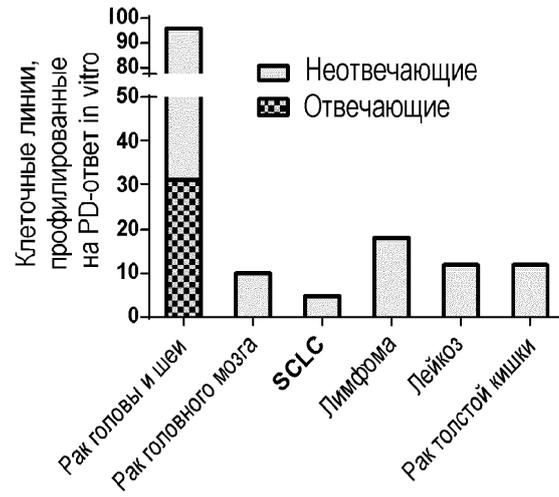
WN10A_H	CHGTGGSCQLKTCW
WN10B_H	CHGTGGSCQFKTCW
WNT6_HU	CHGLGGSCALRTCW
WNT3_HU	CHGLGGSCVVKTCW
WNT3A_H	CHGLGGSCVVKTCW
WNT1_HU	CHGMGGSCTVVRTCW
WNT4_HU	CHGVGGSCVVKTCW
WNT7A_H	CHGVGGSCTTKTCW
WNT7B_H	CHGVGGSCTTKTCW
WNT16_H	CHGVGGSCAVKTCW
WNT2_HU	CHGVGGSCTLRTCW
WNT2B_H	CHGVGGSCTLRTCW
WNT5A_H	CHGVGGSCSLKTCW
WNT5B_H	CHGVGGSCSLKTCW
WNT8A_H	CHGIGGSCSIQTCW
WNT8B_H	CHGVGGSCTTQTCW
WNT11_H	CHGVGGSCSIRTCW
WNT9A_H	CHGVGGSCTVVRTCW
WNT9B_H	CHGVGGSCAVRTCW
	*** *** **

ФИГ.5С

Анализ	IC ₅₀ соединения А (нМ)
Wnt1 (RGA)	1.1
Wnt2 (RGA)	0.2
Wnt3 (RGA)	0.6
Wnt3a (RGA)	0.9
Wnt6 (RGA)	0.2
Wnt7a (RGA)	2.4
Wnt9a (RGA)	0.05

6/17

ФИГ.6



7/17

ФИГ.7

№	Названия линий клеток рака головы и шеи	Ответ в виде снижения аксина 2	Ингибирование аксина 2 (1-обработанные/ контроль)	№	Названия линий клеток рака головы и шеи	Ответ в виде снижения аксина 2	Ингибирование аксина 2 (1-обработанные/ контроль)
1	A-253	Нет	0	21	UMSCC 10A	Да	0.5
2	CAL27	Да	0.7	22	UMSCC 10B	Нет	0.3
3	Detroit 562	Нет	0.2	23	UMSCC 11A	Да	0.6
4	FaDu	Нет	0	24	UMSCC 11B	Да	0.6
5	HN30	Да	0.9	25	UMSCC 12	Нет	0.4
6	Hs 840.T	Нет	0	26	UMSCC 13	Да	0.9
7	SCC-4	Нет	0.4	27	UMSCC 14A	Нет	0.0
8	SCC-9	Нет	0	28	UMSCC 14B	Да	0.5
9	SCC-25	Нет	0.1	29	UMSCC 14C	Да	0.7
10	SNU-1066	Нет	0.3	30	UMSCC 16	Нет	0.3
11	SNU-1076	Да	0.9	31	UMSCC 17A	Нет	0.3
12	UMSCC 1	Да	0.9	32	UMSCC 17B	Да	0.6
13	UMSCC 2	Нет	0.2	33	UMSCC 19	Да	0.5
14	UMSCC 3	Нет	0.0	34	UMSCC 21A	Нет	0.1
15	UMSCC 4	Нет	0.3	35	UMSCC 22A	Нет	0.3
16	UMSCC 5	Нет	0.3	36	UMSCC 22B	Нет	0.0
17	UMSCC 6	Да	0.9	37	UMSCC 23	Нет	0.3
18	UMSCC 7	Нет	0.4	38	UMSCC 25	Да	0.9
19	UMSCC 8	Нет	0.4	39	UMSCC 26	Нет	0.3
20	UMSCC 9	Да	0.8	40	UMSCC 28	Да	0.7

8/17

ФИГ.7 – продолжение

№	Названия линий клеток рака головы и шеи	Ответ в виде снижения аксина 2	Ингибирование аксина 2 (1-обработанные/ контроль)	№	Названия линий клеток рака головы и шеи	Ответ в виде снижения аксина 2	Ингибирование аксина 2 (1-обработанные/ контроль)
41	UMSCC 29	Да	0.7	63	UMSCC 53	Нет	0.1
42	UMSCC 30	Нет	0.3	64	UMSCC 55	Нет	0.0
43	UMSCC 31	Нет	0	65	UMSCC 58	Нет	0.4
44	UMSCC 33	Нет	0.2	66	UMSCC 59	Да	0.7
45	UMSCC 34	Да	0.9	67	UMSCC 60	Нет	0.2
46	UMSCC 35	Да	0.6	68	UMSCC 62	Нет	0.3
47	UMSCC 36	Нет	0.0	69	UMSCC 63	Да	0.8
48	UMSCC 37	Нет	0.0	70	UMSCC 67	Нет	0.2
49	UMSCC 38	Да	0.5	71	UMSCC 69	Нет	0.4
50	UMSCC 39	Нет	0.0	72	UMSCC 70	Нет	0.3
51	UMSCC 40	Нет	0.3	73	UMSCC 71	Нет	0.2
52	UMSCC 41	Да	0.6	74	UMSCC 73B	Нет	0.4
53	UMSCC 42	Нет	0.3	75	UMSCC 74A	Нет	0.0
54	UMSCC 43	Да	0.7	76	UMSCC 74B	Нет	0.0
55	UMSCC 44	Нет	0.0	77	UMSCC 76	Да	0.7
56	UMSCC 45	Да	0.5	78	UMSCC 77	Нет	0.2
57	UMSCC 46	Да	0.5	79	UMSCC 78	Нет	0.0
58	UMSCC 47	Нет	0.3	80	UMSCC 80	Нет	0.0
59	UMSCC 49	Нет	0.2	81	UMSCC 81A	Нет	0.0
60	UMSCC 50	Нет	0.1	82	UMSCC 81B	Нет	0.3
61	UMSCC 51	Нет	0.4	83	UMSCC 83A	Нет	0.2
62	UMSCC 52	Нет	0.2	84	UMSCC 83B	Нет	0.4

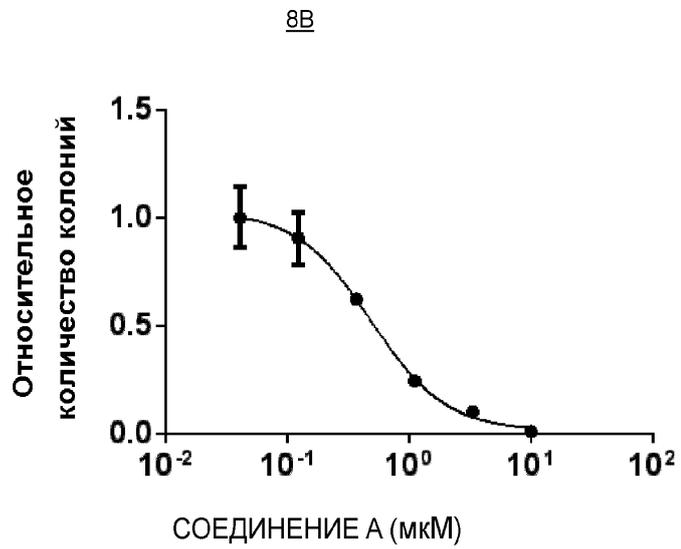
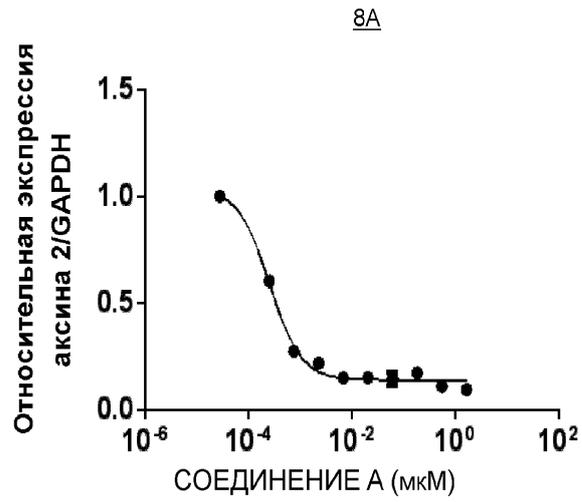
9/17

ФИГ.7 – продолжение

№	Названия линий клеток рака головы и шеи	Ответ в виде снижения аксина 2	Ингибирование аксина 2 (1-обработанные/ контроль)	№	Названия линий клеток рака головы и шеи	Ответ в виде снижения аксина 2	Ингибирование аксина 2 (1-обработанные/ контроль)
85	UMSCC 85	Нет	0.0	91	UMSCC 98	Нет	0.1
86	UMSCC 90	Да	0.5	92	UMSCC 103	Нет	0.0
87	UMSCC 92	Да	0.9	93	UMSCC 104	Нет	0.0
88	UMSCC 93	Да	0.6	94	UMSCC 105	Нет	0.3
89	UMSCC 94	Нет	0.3	95	UMSCV 1A	Нет	0.0
90	UMSCC 97	Да	0.8	96	UMSCV 6	Нет	0.1

10/17

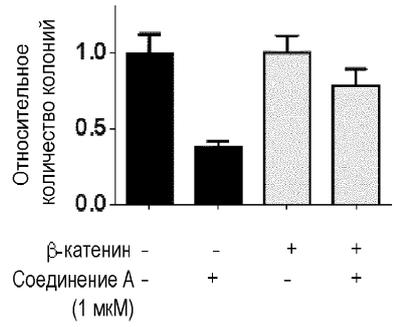
ФИГ. 8



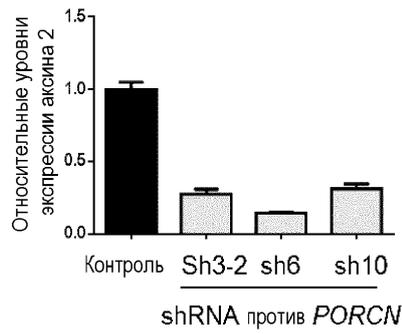
11/17

ФИГ.9

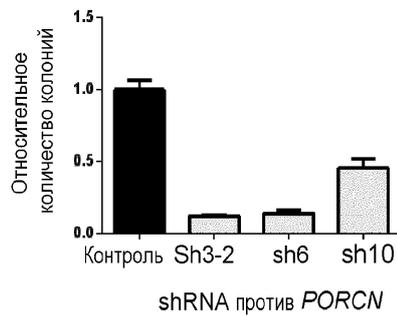
9A



9B



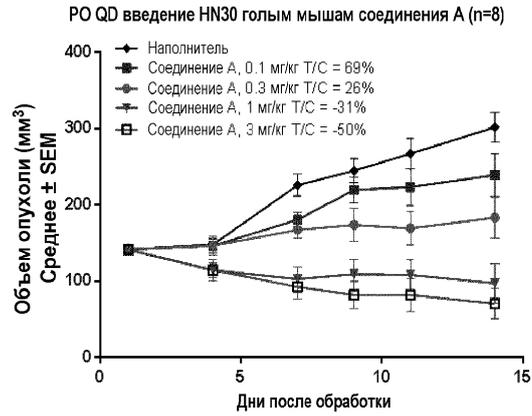
9C



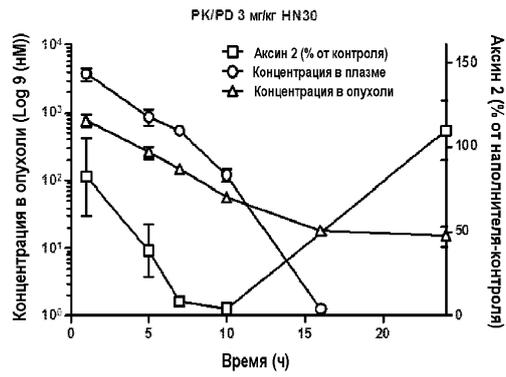
12/17

ФИГ.10

10А



10В



10С



13/17

ФИГ.11

<u>Гены</u>	<u>Частота мутаций</u>
<u>TP53</u>	<u>27/40 (68%)</u>
<u>CDKN2A</u>	<u>7/40 (18%)</u>
<u>Notch1</u>	<u>10/40 (25%)</u>
<u>PTEN</u>	<u>1/40 (3%)</u>
<u>HRAS</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>PIK3CA</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>Notch2</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>Notch3</u>	<u>2/40 (5%)</u>

14/17

ФИГ.12

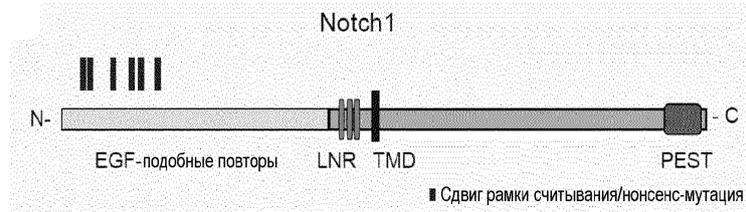
Ген	Геномное изменение	Изменение аминокислотной последовательности	Отвечающие мутанты	Устойчивые мутанты	Фактор обогащения
FAM58A	g.chrX:152864477G>GC g.chrX:152858079GC>G g.chrX:152864513G>GC	A18fs, A181fs, A6fs	11	1	6.6
FLJ43860	g.chr8:142459777C>CA	L850fs	7	1	4.2
NOTCH1	g.chr9:139411813AC>A g.chr9:139411793TG>T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

fs сдвиг рамки считывания; X: нонсенс-мутации

15/17

ФИГ.13

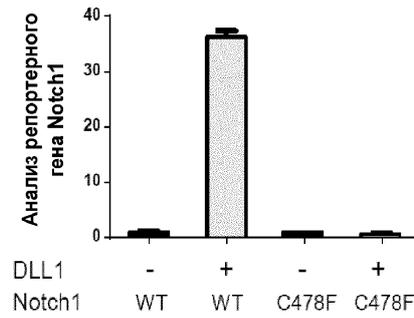
13A



13B

Клеточная линия	Отвечающая на соединение А	Мутация Notch1
UMSCC 25	Да	E488fs
UMSCC 28	Да	A495fs
UMSCC 29	Да	K538fs
UMSCC 47	Нет	G192X
UMSCC 59	Да	P460fs
UMSCC 76	Да	E216X

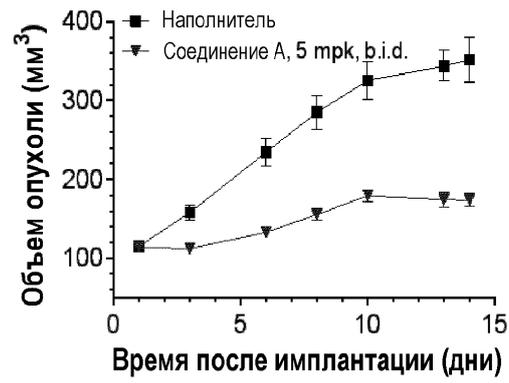
13C



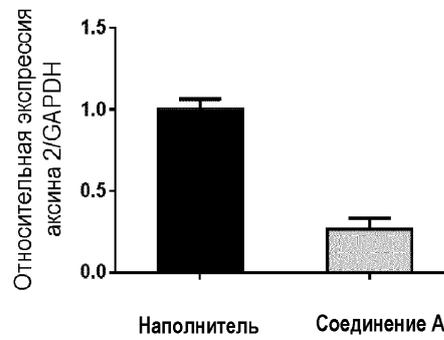
16/17

ФИГ.14

14A



14B



17/17

ФИГ.15

Клеточная линия	Отвечающая на соединение А	Мутация FAT1
UMSCC 63	Да	P2559S
UMSCC 11A	Да	D4109G
UMSCC 41	Да	G4147C
UMSCC 35	Да	P2559L
UMSCC-25	Да	N524fs
UMSCC-43	Да	M1150fs
UMSCC 8	Нет	Q3887X

ФИГ.16

Клеточная линия	Отвечающая на соединение А	Мутация HRAS
UMSCC 17B	Да	Q61L
UMSCC 43	Да	G12V
UMSCC 63	Да	G13D
UMSCC 17A	Нет	Q61L
HN30	Да	G12D