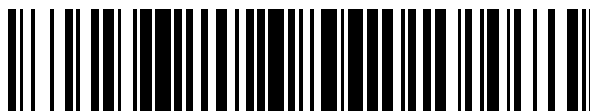


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 829**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2013 PCT/US2013/059967**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14043633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2013 E 13837050 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2895623**

54 Título: **Uso de e-cadherina y vimentina para la selección de pacientes que responden al tratamiento**

30 Prioridad:

17.09.2012 US 201261702091 P
26.03.2013 US 201361805512 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2018

73 Titular/es:

AGIOS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
88 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

HUROV, JONATHAN;
CHOE, SUNG EUN y
ULANET, DANIELLE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 690 829 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de e-cadherina y vimentina para la selección de pacientes que responden al tratamiento

5 Antecedentes de la invención

Las células cancerosas dependen principalmente en la glucólisis para generar energía celular e intermediarios bioquímicos para la biosíntesis de lípidos y nucleótidos, mientras que la mayoría de las células "normales" en tejidos adultos utilizan la respiración aeróbica. Esta diferencia fundamental en el metabolismo celular entre las células cancerosas y las células normales se denomina Efecto Warburg. Como resultado de esta diferencia, el piruvato generado a través de la vía glucolítica se convierte en ácido láctico, en lugar de usarse para acetil-CoA y, eventualmente, el citrato utilizado en un ciclo de ácido cítrico normal. Para compensar estos cambios energéticos y mantener un ciclo de ácido cítrico, las células cancerosas dependen del metabolismo de la glutamina que se logra mediante, por ejemplo, una elevación de la actividad de la glutaminasa. La explotación de este fenómeno se puede lograr mediante la inhibición de enzimas que utilizan glutamina, por ejemplo, la actividad elevada de glutaminasa. Se ha demostrado que la glutaminasa renal activada con fosfato (GLS1/KGA) promueve la proliferación de células cancerígenas, al menos en parte, a través de la anaplerosis del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). La GLS1 no se muta o amplifica con frecuencia en los tumores, lo que dificulta la selección de pacientes para el tratamiento con un inhibidor de GLS. Por lo tanto, se necesitan métodos para evaluar y/o seleccionar pacientes para el tratamiento con inhibidores de GLS.

Thangavelu et al (2012), documento US2012/141479, HSIU-NI Kung et al (2011), Wise et al (2010), Chun-yu Lin et al (2011), Cas et al (2012) y Anupam Kumar et al divulgan agentes, métodos y kits para tratar/evaluar a un paciente que tiene cáncer.

25 Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para evaluar a un paciente que tiene cáncer para el tratamiento con un inhibidor de enzima que utiliza glutamina o un agente que reduce la glutamina, comprendiendo el método:

evaluar una muestra del paciente, en la que la muestra se evalúa para i) el nivel de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia o ii) el nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia; y

35 determinar tratar al paciente con el inhibidor de la enzima que utiliza glutamina o el agente que agota la glutamina si la muestra se caracteriza por i) un bajo nivel de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia y ii) un alto nivel de expresión de vimentina en comparación a un estándar de referencia.

40 En una realización, la muestra se evalúa adicionalmente para el nivel de expresión de piruvato carboxilasa en comparación con un estándar de referencia; y

se determina tratar al paciente con el inhibidor de la enzima que utiliza glutamina o el agente que agota la glutamina si la muestra se caracteriza adicionalmente por una expresión de piruvato carboxilasa baja o disminuida en comparación con un estándar de referencia.

En una realización, la invención proporciona un método en el que:

50 (a) el nivel de expresión de E-cadherina puede ser al menos una disminución de expresión de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia; y/o

(b) el nivel de expresión de vimentina puede ser un aumento de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia; y/o

55 (c) el nivel de expresión de E-cadherina se puede medir mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica E-cadherina; y/o

(d) el nivel de expresión de vimentina se puede medir mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica la vimentina; y/o

60 (e) el nivel de expresión de E-cadherina puede evaluarse por el nivel de expresión de la proteína E-cadherina; y/o

(f) el nivel de expresión de vimentina puede evaluarse por el nivel de expresión de la proteína vimentina.

En algunas realizaciones, el paciente puede evaluarse para el tratamiento con un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina. El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina puede inhibir una glutaminasa. La glutaminasa puede ser GLS1 o glutaminasa C (GAC). El inhibidor puede ser bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro (BPTES).

5 En algunas realizaciones, el paciente puede evaluarse para el tratamiento con un agente que agota la glutamina. El agente que agota la glutamina puede ser una asparaginasa o una glutaminasa.

En algunas realizaciones, el cáncer puede ser cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas.

10 También se describen aquí, inter alia, métodos para tratar a un paciente que tiene cáncer, comprendiendo el método: opcionalmente, adquirir una muestra de un paciente; adquirir una evaluación de o evaluar la muestra, en el que la muestra se caracteriza por i) un nivel bajo de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia o ii) un alto nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia; y administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina.

15 En un aspecto de la divulgación, los métodos descritos aquí proporcionan, inter alia, métodos para tratar a un paciente que tiene cáncer, comprendiendo el método: opcionalmente, adquirir una muestra de un paciente; adquirir una evaluación de o evaluar la muestra, en el que la muestra se caracteriza como una célula mesenquimatososa en comparación con un estándar de referencia; y administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina. En algunas realizaciones de la divulgación, la célula caracterizada como mesenquimatososa se compara con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia se caracteriza como una célula mesenquimatososa como se describe en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).

20 En un aspecto de la divulgación, los métodos descritos aquí proporcionan, inter alia, métodos para tratar a un paciente que tiene cáncer, comprendiendo el método: opcionalmente, adquirir una muestra de un paciente; adquirir una evaluación de o evaluar la muestra, en el que la muestra se caracteriza por i) un nivel bajo de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia o ii) un alto nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia; y administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que agota la glutamina.

25 En un aspecto de la divulgación, los métodos descritos aquí proporcionan, inter alia, métodos para tratar a un paciente que tiene cáncer, comprendiendo el método: opcionalmente, adquirir una muestra de un paciente; adquirir una evaluación de o evaluar la muestra, en el que la muestra se caracteriza por i) un nivel bajo de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia o ii) un alto nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia; y administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa (por ejemplo, GLS1 o glutaminasa C (GAC))). En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza por niveles bajos o reducidos de expresión de piruvato carboxilasa en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza por una capacidad disminuida para la fosforilación oxidativa en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza por una capacidad disminuida para responder al estrés mitocondrial en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza por un uso reducido de piruvato endógeno para la respiración celular. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza por una dependencia de la glutamina para la respiración celular.

30 En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza por i) un bajo nivel de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia y ii) un alto nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza o se caracteriza adicionalmente por niveles bajos o reducidos de expresión de piruvato carboxilasa en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza o se caracteriza adicionalmente por una capacidad disminuida para la fosforilación oxidativa en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza o se caracteriza adicionalmente por una capacidad disminuida para responder al estrés mitocondrial en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza o se caracteriza adicionalmente por un uso reducido de piruvato endógeno para la respiración celular. En algunas realizaciones de la divulgación, la muestra se caracteriza o se caracteriza adicionalmente por una dependencia de la glutamina para la respiración celular.

35 En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de E-cadherina se compara con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es el nivel de expresión de E-cadherina en una célula epitelial como se caracteriza en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21(suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442). En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de E-cadherina se mide mediante la evaluación del

5 nivel de ARN que codifica E-cadherina. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de E-cadherina se evalúa por el nivel de expresión de la proteína de E-cadherina. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de E-cadherina es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% menor que el estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de E-cadherina es al menos una disminución en la expresión de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia.

10 En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de vimentina se compara con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es el nivel de expresión de vimentina en una célula epitelial como se caracteriza en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21(suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442). En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de vimentina se mide mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica la vimentina. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de vimentina se evalúa por el nivel de expresión de la proteína de vimentina. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de vimentina es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% mayor que el estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de vimentina es al menos un aumento en la expresión de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia.

20 En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa es bajo o disminuido en comparación con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es el nivel de expresión de piruvato carboxilasa en una célula epitelial como se caracteriza en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21(suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442). En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa es alto o aumentado en comparación con el estándar de referencia. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa se mide mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica el piruvato carboxilasa. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de vimentina se evalúa por el nivel de expresión de la proteína de piruvato carboxilasa. En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% mayor que el estándar de referencia.

30 En algunas realizaciones de la divulgación, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa es al menos un aumento en la expresión de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia.

35 En algunas realizaciones de la divulgación, el agente que agota la glutamina es una asparaginasa (tal como Elspar® (Merck), Oncaspar® (Sigma Tau/Enzon) y Erwinaze® (EUSA)), una glutaminasa que incluye formas pegiladas (tales como las descritas en los documentos US7,052,689 y US6,312,939) o GlutaDon (como se describe en el documento US2009/0169537).

40 En algunas realizaciones de la divulgación, el inhibidor de glutaminasa (GLS) es bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro (BPTES). En algunas realizaciones de la divulgación, los inhibidores de GLS son como se describen en los documentos US 6,451,828; WO2010/111504 (US2012/0220610); WO2012/034123; WO2011/143160; US5,552,427 y WO2010/033871. En algunas realizaciones de la divulgación, el inhibidor de enzima que utiliza glutamina es como se describe en el documento US7,714,007, tal como un inhibidor de amidotransferasas, ácido graso de cadena larga, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), N-etilmaleimida (NEM), p-cloromercurifenilsulfonato (pCMPS), ácido L-2-amino-4-oxo-5-cloropentóico, DON más o-carbamoil-L-serina, acivicina [(alfaS,5S)-alfa-amino-3-cloro-4,5-dihidro-5-ácido isoxazolacético], azaserina, palmitoil coenzima A (CoA), estearoil CoA, azul de bromotimol y dicoumarol.

50 En algunas realizaciones de la divulgación, el inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina se administra en combinación con un segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones de la divulgación, el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones de la divulgación, el segundo agente terapéutico es un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), por ejemplo, cetuximab, panitumumab, gefitinib, erlotinib, nimotuzamab, matuzamab, zalutumumab o lapatinib.

55 En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es cáncer de mama. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones de la divulgación el cáncer es osteosarcoma, lipomas, condrosarcoma o mesotelioma. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es osteosarcoma. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es lipomas. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es condrosarcoma. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es mesotelioma.

65 En un aspecto, la invención proporciona un método para evaluar un paciente que tiene cáncer para el tratamiento con un inhibidor de enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, un inhibidor de GLS (por ejemplo, GLS1 o GAC)) o un agente que agota la glutamina, comprendiendo el método: evaluar o adquirir una evaluación de una muestra de un paciente, en el que la muestra se evalúa para i) un bajo nivel de expresión de E-cadherina en comparación con un

estándar de referencia o ii) un alto nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia; y determinar tratar al paciente con un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, un inhibidor GLS (por ejemplo, GLS 1 o GAC)) o un agente que agota la glutamina si la muestra se caracteriza por i) un bajo nivel de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia o ii) un alto nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia.

En algunas realizaciones, la muestra se caracteriza por niveles bajos o reducidos de expresión de piruvato carboxilasa en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones, la muestra se caracteriza por una capacidad disminuida para la fosforilación oxidativa en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones, la muestra se caracteriza por una capacidad disminuida para responder al estrés mitocondrial en comparación con un estándar de referencia. En algunas realizaciones, la muestra se caracteriza por un uso reducido de piruvato endógeno para la respiración celular. En algunas realizaciones, la muestra se caracteriza por una dependencia de la glutamina para la respiración celular.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de E-cadherina se compara con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es el nivel de expresión de E-cadherina en una célula epitelial como se caracteriza en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21(suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442). En algunas realizaciones, el nivel de expresión de E-cadherina es bajo, disminuido o ausente en comparación con el estándar de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de E-cadherina se mide mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica E-cadherina. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de E-cadherina se evalúa por el nivel de expresión de la proteína E-cadherina. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de E-cadherina es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% menos que el estándar de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de E-cadherina es al menos una disminución en la expresión de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de vimentina se compara con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es el nivel de expresión de vimentina en una célula epitelial como se caracteriza en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442). En algunas realizaciones, el nivel de expresión de vimentina se mide mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica la vimentina. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de vimentina se evalúa por el nivel de expresión de la proteína vimentina. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de vimentina es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% mayor que el estándar de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de vimentina es al menos un aumento en la expresión de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa es bajo o disminuido en comparación con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es el nivel de expresión de piruvato carboxilasa en una célula epitelial como se caracteriza en cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al. (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa es alto o aumentado en comparación con el estándar de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa se mide mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica el piruvato carboxilasa. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de vimentina se evalúa por el nivel de expresión de la proteína piruvato carboxilasa. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% mayor que el estándar de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de piruvato carboxilasa es al menos un aumento en la expresión de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia.

En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, el cáncer es osteosarcoma, lipomas, condrosarcoma o mesotelioma. En algunas realizaciones, el cáncer es osteosarcoma. En algunas realizaciones, el cáncer es lipomas. En algunas realizaciones, el cáncer es condrosarcoma. En algunas realizaciones, el cáncer es mesotelioma.

En algunas realizaciones, después de la evaluación, el método comprende además seleccionar un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, un inhibidor de GLS (por ejemplo, GLS1 o GAC)) para el tratamiento del paciente.

En algunas realizaciones, después de la evaluación, el método comprende además seleccionar un agente que agota la glutamina para el tratamiento del paciente.

En algunas realizaciones, posterior a la evaluación, el método comprende además seleccionar un inhibidor de GLS para el tratamiento del paciente.

5 En un aspecto de la divulgación, se proporciona un kit o producto que comprende un medio para ensayar el nivel de expresión génica de E-cadherina y/o vimentina y/o piruvato carboxilasa. En algunas realizaciones de la divulgación, el kit o producto comprende un agente capaz de interactuar con un producto de expresión génica de E-cadherina. En algunas realizaciones de la divulgación, el kit o producto comprende un agente capaz de interactuar con un producto de expresión génica de vimentina. En alguna realización de la divulgación, el kit o producto comprende un agente capaz de interactuar con un producto de expresión génica de E-cadherina y un agente capaz de interactuar con un producto de expresión génica de vimentina. En algunas realizaciones de la divulgación, el agente es un anticuerpo. En algunas realizaciones de la divulgación, el agente es un oligonucleótido. En algunas realizaciones de la divulgación, el producto de expresión génica es una molécula de ARN. En algunas realizaciones de la divulgación, el producto de expresión génica es una molécula de ARNm. En algunas realizaciones de la divulgación, el producto de expresión génica es un polipéptido o proteína.

15 En un aspecto de la divulgación, los métodos descritos aquí proporcionan, inter alia, métodos para tratar a un paciente que tiene cáncer, comprendiendo el método: opcionalmente, adquirir una muestra de un paciente; adquirir una evaluación de o evaluar la muestra, en el que la muestra se caracteriza por i) una capacidad disminuida de fosforilación oxidativa en comparación con un estándar de referencia o ii) una capacidad disminuida para responder al estrés mitocondrial en comparación con un estándar de referencia o iii) un uso disminuido de piruvato endógeno para la respiración celular o iv) una dependencia en glutamina para la respiración celular; y administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina.

25 En un aspecto de la divulgación, los métodos descritos aquí proporcionan, inter alia, métodos para tratar a un paciente que tiene cáncer, comprendiendo el método: opcionalmente, adquirir una muestra de un paciente; adquirir una evaluación de o evaluar la muestra, en el que la muestra se caracteriza por i) una capacidad disminuida de fosforilación oxidativa en comparación con un estándar de referencia o ii) una capacidad disminuida para responder al estrés mitocondrial en comparación con un estándar de referencia o iii) un uso disminuido de piruvato endógeno para la respiración celular o iv) una dependencia en glutamina para la respiración celular; y administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que agota la glutamina.

30 En un aspecto de la divulgación, los métodos descritos aquí proporcionan, inter alia, métodos para tratar a un paciente que tiene cáncer, comprendiendo el método: opcionalmente, adquirir una muestra de un paciente; adquirir una evaluación de o evaluando la muestra, en el que la muestra se caracteriza por i) una capacidad disminuida de fosforilación oxidativa en comparación con un estándar de referencia o ii) una capacidad disminuida para responder al estrés mitocondrial en comparación con un estándar de referencia o iii) un uso disminuido de piruvato endógeno para la respiración celular o iv) una dependencia en glutamina para la respiración celular; y administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa (por ejemplo, GLS1 o glutaminasa C (GAC))).

40 En algunas realizaciones de la divulgación, la capacidad de fosforilación oxidativa es baja o disminuida en comparación con un estándar de referencia, en donde el estándar de referencia es la capacidad de fosforilación oxidativa en una célula epitelial como se caracteriza en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).

45 En algunas realizaciones de la divulgación, la capacidad para responder al estrés mitocondrial es baja o disminuida en comparación con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es la capacidad de responder al estrés mitocondrial en una célula epitelial como se caracteriza en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21(suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).

50 En algunas realizaciones de la divulgación, el uso de piruvato endógeno para la respiración celular es bajo o disminuido en comparación con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es el uso de piruvato endógeno para la respiración celular en una célula epitelial como se caracteriza en cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl. 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).

55 En algunas realizaciones de la divulgación, la dependencia en glutamina para la respiración celular es baja o disminuida en comparación con un estándar de referencia, en el que el estándar de referencia es la dependencia en glutamina para la respiración celular en una célula epitelial como se caracteriza en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21(suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).

60 En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es cáncer de mama. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es osteosarcoma, lipomas, condrosarcoma o mesotelioma. En

algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es osteosarcoma. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es lipoma. En algunas realizaciones de la divulgación, el cáncer es condrosarcoma. En algunos aspectos de la divulgación, el cáncer es mesotelioma.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, posterior a la evaluación, el método comprende además seleccionar un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, un inhibidor de GLS (por ejemplo, GLS1 o GAC)) para el tratamiento del paciente.

10 En algunas realizaciones de la divulgación, después de la evaluación, el método comprende adicionalmente seleccionar un agente reductor de glutamina para el tratamiento del paciente.

En algunas realizaciones de la divulgación, posterior a la evaluación, el método comprende además seleccionar un inhibidor de GLS para el tratamiento del paciente.

15 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa las curvas de respuesta de crecimiento de tres líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas (LXF-289; NCI-H1703; NCI-H460) tratadas con concentraciones variables de BPTES inhibidor de GLS.

20 La figura 2 representa las 25 vías principales asociadas con la sensibilidad o resistencia a BPTES y la correlación con el efecto de BPTES sobre crecimiento celular ($\mu/\mu_{m\acute{a}x}$). Las filas sombreadas representan 4 vías relacionadas con la transición epitelial-mesenquimal (rangos 1, 15, 23, 25).

25 La figura 3A representa un análisis de inmunoprecipitación Western de 20 líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas para los niveles de proteína de E-cadherina, vimentina, PC (piruvato descarboxilasa), GLS (glutaminasa activada con fosfato) e histona 3 (control). La sensibilidad de cada línea celular a BPTES se indica como sensible, intermedia o insensible. La figura 3B representa la expresión de la proteína GAC y PC (piruvato descarboxilasa) en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas que se caracterizan por ser
30 sensibles, intermedias o insensibles a BPTES.

La figura 4A representa un análisis de inmunoprecipitación Western de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas NCI-H358 para los niveles de proteína de E-cadherina, vimentina, PC (piruvato descarboxilasa), GLS (glutaminasa activada con fosfato) y actina (control). La figura 4B representa las curvas de
35 respuesta de crecimiento de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas NCI-H358 tratadas con concentraciones variables de BPTES, inhibidor de GLS y cultivadas en presencia o ausencia de TGF β .

La figura 5A representa las curvas de respuesta de crecimiento de cinco líneas celulares de cáncer de mesotelioma (H28; MSTO-211H; H2052; H226; H2452) tratadas con concentraciones variables de BPTES, inhibidor de GLS. La
40 línea celular Met-5A es una línea celular de mesotelioma normal. La figura 5B representa las veces de crecimiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento promedio de cinco líneas celulares de cáncer de mesotelioma (H28; MSTO-211H; H2052; H226; H2452) tratadas con 10 μ M de BPTES, inhibidor de GLS. La línea celular Met-5A es una línea celular de mesotelioma normal. La figura 5C representa un análisis de inmunoprecipitación Western de líneas
45 celulares de cáncer de mesotelioma para niveles de proteína de GLS1 (glutaminasa 1 activada con fosfato), GAC y actina (control); en ausencia de BPTES, inhibidor de GLS (el panel superior de la figura es la señal de proteína después de un tiempo de exposición de revelado corto y el panel central es la señal de proteína después de un tiempo de exposición de revelado prolongado). La línea celular Met-5A es una línea celular de mesotelioma normal.

La figura 6A representa un análisis de inmunoprecipitación Western de cinco líneas celulares de mesotelioma para niveles de proteína de E-cadherina, vimentina, PC (piruvato descarboxilasa), β -catenina; y actina (control); en presencia (panel superior) y ausencia de (panel inferior) del inhibidor de GLS, BPTES. La figura 6B representa las
50 curvas de respuesta de crecimiento de dos líneas celulares de mesotelioma (H28; y MSTO-211H) tratadas con concentraciones variables de BPTES, inhibidor de GLS.

55 La figura 7 representa las estructuras de BPTES y el compuesto I.

La figura 8 representa la dependencia de GLS1 en líneas celulares de cáncer seleccionadas. La figura 8A
representa un análisis de inmunoprecipitación Western de los niveles de proteína GLS1 y GLS2 en las líneas celulares indicadas. Se indican las variantes de empalme alternativas KGA y GAC. La figura 8B representa las líneas
60 celulares que se ensayaron para determinar la sensibilidad al tratamiento con BPTES en un ensayo de proliferación de 72 horas usando CellTiter-Glo en formato de 96 pozos. Se informa sobre el tejido de origen, el IC₅₀ promedio y el porcentaje de inhibición del crecimiento a la dosis máxima de BPTES. La figura 8C representa curvas de crecimiento representativas con el tratamiento con BPTES a partir de líneas celulares indicadas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con la media y la desviación estándar (SD) indicadas (Nota: BPTES tiene una solubilidad acuosa deficiente. Dosificar células por encima de 10 mM da como resultado la
65 precipitación del compuesto).

La figura 9 es un gráfico de líneas que representa la comparación de dos métodos diferentes de medición de viabilidad. Crecimiento de células A427 tratadas con BPTES 8 mM medidas por, figura 9A, CellTiter-Glo y figura 9B, Syto60. A las 72 horas, los descensos en los niveles de ATP medidos por CellTiter-Glo son equivalentes a disminuciones en la densidad celular medidas por tinción de Syto60. Las células A427 equivalentes se colocaron en placas de 96 pozos y se trataron con DMSO o BPTES 8 mM. Las mediciones de CellTiter-Glo y Syto60 se tomaron a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la adición del fármaco.

La figura 10 muestra que los efectos antiproliferativos y metabólicos del tratamiento con BPTES dependen de GLS1. Se trataron células originales A427 o líneas que expresan establemente control de vector vacío pLVX (Con), GAC de tipo salvaje (GAC) o una enzima GAC resistente a BPTES (GAC-BR) con concentraciones indicadas de fármacos en un ensayo de proliferación de 72 horas. La figura 10A muestra células tratadas con BPTES que indican el crecimiento de células tratadas con el fármaco en relación con el tratamiento con DMSO. La figura 10B muestra células tratadas con análogo inactivo (Compuesto I) que indica el crecimiento de las células tratadas con el fármaco en relación con las tratadas con DMSO. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con media y desviación estándar indicados en la figura 10C y figura 10D). Medición del isotópomo marcado $^{13}\text{C}(5)$ -Glu (figura 10C) o $^{13}\text{C}(4)$ -Asp (figura 10D) de células tratadas durante 4 horas con BPTES o con compuesto I análogo inactivo. Los resultados son la media de tres repeticiones con la desviación estándar indicada. Valores p calculados de la prueba t de Student, $*(3 \times 10^{-8})$, $** (10^{-9})$, $\# (10^{-7})$, $\#\# (2 \times 10^{-6})$.

La figura 11 muestra que los efectos antiproliferativos y metabólicos del tratamiento con BPTES dependen de GLS1. Las líneas celulares MDA-MB-231 que expresan establemente control de vector vacío (Con), GAC de tipo salvaje (GAC) o una enzima GAC resistente a BPTES (GAC-BR) se trataron con concentraciones indicadas de fármacos en un ensayo de proliferación de 72 horas. La figura 11A muestra células tratadas con BPTES que indican crecimiento de células tratadas con fármaco en relación con DMSO (figura 11B). Células tratadas con análogo inactivo (compuesto I) indicando crecimiento de células tratadas con fármaco en relación con DMSO. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con media y desviación estándar indicada (figura 11C y figura 11D). Medición de isotópomo marcado $^{13}\text{C}(5)$ -Glu (figura 11C) o $^{13}\text{C}(4)$ -Asp (figura 11D) de células tratadas durante 4 horas con BPTES o con el Compuesto I análogo inactivo. Los resultados son la media de tres repeticiones con la desviación estándar indicada. Valores p calculados de la prueba t de Student, $*(3 \times 10^{-5})$, $** (7 \times 10^{-10})$, $\# (3 \times 10^{-5})$, $\#\# (5 \times 10^{-7})$.

La figura 12 muestra la validación de los niveles de expresión de glutaminasa C (GAC) en líneas celulares A427 pLVX-GAC y pLVX-GAC-BR. Análisis de la expresión de ARN de las líneas celulares pLVX-vacío (Con), pLVX-GAC (GAC) y pLVX-GAC-BR (GAC-BR) usando una variante de empalme de glutaminasa C (específica de GAC) sonda Taqman. La expresión relativa normalizada a actina se representa con una desviación estándar. Se indican las veces de aumento en la expresión de las líneas GAC y GAC-BR (1,8x y 1,4x, respectivamente). Los valores p de la prueba t de Student fueron (*) $p=0,003$ y (**) $p=0,001$.

La figura 13 representa un diagrama que destaca la contribución de la actividad de glutamina y GLS1 a la generación de intermedios de glutamato, aspartato y TCA. Los cinco carbonos de glutamina resaltados en rojo representan el ^{13}C isotópomo $^{13}\text{C}(5)$ -glutamina totalmente marcado. Estos átomos ^{13}C se pueden rastrear a través del producto inmediato corriente abajo de la actividad de glutaminasa a $^{13}\text{C}(5)$ -glutamato (en recuadro, a la derecha) y después de múltiples etapas enzimáticas a $^{13}\text{C}(4)$ -aspartato (en recuadro, a la izquierda).

La figura 14 representa la expresión de GLS1 (KGA y GAC) y la proteína GLS2 en tejidos humanos normales. La figura 14A representa una inmunoprecipitación para la expresión de GLS1 en tejidos humanos normales. La figura 14B representa una inmunoprecipitación para la expresión de GLS2 en tejidos humanos normales.

La figura 15 representa la correlación entre disminuciones en los niveles de metabolitos intracelulares y efectos antiproliferativos de la inhibición de GLS1. La figura 15A ATP intracelular y niveles de glutamato figura 15B restantes después del tratamiento de 24 horas con BPTES 10 mM en 15 líneas celulares tumorales. La sensibilidad de las líneas celulares trazadas en el intervalo del eje x del 96%-1% de inhibición en un ensayo de viabilidad de 72 horas, en orden de izquierda a derecha. Los resultados se trazan como media y desviación estándar de 3 experimentos independientes. Coeficiente de correlación de Pearson para ATP/inhibición del crecimiento= 0,79, glutamato/inhibición del crecimiento= 0,71 ($p=0,0002$ y $p=0,002$, respectivamente).

Descripción detallada

Ciertos términos se definen primero. Los términos adicionales se definen a lo largo de la especificación.

"Adquiere" o "adquirir" según se usan los términos aquí, se refiere a la obtención de la posesión de una entidad física, o un valor, por ejemplo, un valor numérico, mediante la "adquisición directa" o la "adquisición indirecta" de la entidad física o el valor. "Adquirir directamente" significa realizar un proceso (por ejemplo, realizar un método sintético o analítico) para obtener la entidad física o el valor. "Adquirir indirectamente" se refiere a recibir la entidad física o el valor de otra parte o fuente (por ejemplo, un laboratorio de terceros que adquirió directamente la entidad física o el valor). Adquirir directamente una entidad física incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en

- una sustancia física, por ejemplo, un material de partida. Los cambios de ejemplo incluyen hacer una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, cortar o fragmentar una sustancia, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una mezcla, realizar una reacción química que incluya romper o formar un enlace covalente o no covalente. La adquisición directa de un valor incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, por ejemplo, realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, por ejemplo, una muestra, analito o reactivo (algunas veces denominado aquí como "análisis físico"), que realiza un método analítico, por ejemplo, un método que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, por ejemplo, un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, de otra sustancia; combinar un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, por ejemplo, un regulador, disolvente o reactivo; o cambiando la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, por ejemplo, rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiando la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado del mismo, por ejemplo, rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.
- 5 "Adquirir una muestra" como se usa aquí, se refiere a obtener la posesión de una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de ácido nucleico, mediante la "adquisición directa" o la "adquisición indirecta" de la muestra. "Adquirir directamente una muestra" significa realizar un proceso (por ejemplo, realizar un método físico tal como una cirugía o extracción) para obtener la muestra. "Adquirir indirectamente una muestra" se refiere a recibir la muestra de otra parte o fuente (por ejemplo, un laboratorio de terceros que adquirió directamente la muestra). La adquisición directa de una muestra incluye la realización de un proceso que incluye un cambio físico en una sustancia física, por ejemplo, un material de partida, como un tejido, por ejemplo, un tejido en un paciente humano o un tejido que se aisló previamente de un paciente. Los cambios de ejemplo incluyen hacer una entidad física a partir de un material de partida, diseccionar o raspar un tejido; separar o purificar una sustancia (por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de ácido nucleico); combinando dos o más entidades separadas en una mezcla; realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. Adquirir directamente una muestra incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, por ejemplo, como se describió anteriormente.
- 15 Como se usa aquí, una expresión "baja" de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia se refiere a un nivel bajo, disminuido o ausente de la expresión de E-cadherina en comparación con el nivel de expresión de E-cadherina en una célula epitelial como se caracteriza por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).
- 20 Como se usa aquí, un nivel "alto" de vimentina en comparación con un estándar de referencia se refiere a un nivel alto o aumentado de expresión de vimentina en comparación con el nivel de expresión de vimentina en una célula epitelial como se caracteriza por los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).
- 25 Como se usa aquí, un nivel "bajo" o "disminuido" de expresión de piruvato carboxilasa en comparación con un estándar de referencia se refiere a un nivel bajo, disminuido o ausente de expresión de E-cadherina en comparación con el nivel de expresión de E-cadherina en una célula epitelial tal como se caracteriza por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21(suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).
- 30 Como se usa aquí, un agente de agotamiento de glutamina significa un agente que es capaz de agotar la glutamina (tal como una enzima glutaminasa que agota glutamina) o degrada la glutamina.
- 35 Como se usa aquí, un inhibidor de glutaminasa significa un agente que afecta la actividad de la enzima glutaminasa, como inhibidores que pueden afectar el enlace de glutamina, glutamato o diversos cofactores a la enzima (por ejemplo, un inhibidor de glutaminasa puede bloquear el enlace del sustrato glutamina a glutaminasa, inhibe la liberación del producto glutamato de glutaminasa, o bloquea el enlace del cofactor y, por lo tanto, ralentiza la rata catalítica de la enzima); o un agente que inhibe la producción de glutaminasa.
- 40 Como se usa aquí, "cáncer" y "tumor" son términos sinónimos. El término "cáncer" o "tumor" se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de células que causan cáncer, tales como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento rápido y rata de proliferación, y ciertas características morfológicas. Las células cancerosas a menudo se encuentran en la forma de un tumor, pero dichas células pueden existir solas dentro de un animal, o pueden ser células cancerosas no tumorigénicas, como una célula leucémica. Las células pueden poseer características típicas de una célula mesenquimatosas, tales como las caracterizadas en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl. 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).
- 45
- 50
- 55
- 60

Tal como se usa aquí, y a menos que se especifique lo contrario, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" contemplan una acción que ocurre mientras un paciente sufre de un cáncer, lo que reduce la gravedad del cáncer o retrasa o frena la progresión del cáncer.

5 Como se usa aquí, a menos que se especifique lo contrario, una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento de un cáncer, o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con el cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento de un cáncer. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" puede abarcar una cantidad que mejore la terapia general, reduzca o evite los síntomas o las causas del cáncer, o mejore la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

15 El término "paciente" y "sujeto" son sinónimos, y como se usa aquí, se refiere a un animal, típicamente un ser humano (es decir, un hombre o una mujer de cualquier grupo de edad, por ejemplo, un paciente pediátrico o un paciente adulto u otro mamífero, tal como primates (por ejemplo, monos cynomolgus, monos rhesus), mamíferos comercialmente relevantes como el ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, cabras, gatos y/o perros, y/o aves, incluidas aves comercialmente relevantes como pollos, patos, gansos y/o pavos, que serán o hayan sido objeto de tratamiento, observación y/o experimento. Cuando el término se usa junto con la administración de un compuesto o fármaco, entonces el paciente ha sido objeto de tratamiento, observación, y/o administración del compuesto o fármaco.

25 Los métodos descritos aquí proporcionan métodos de evaluación y/o tratamiento de un paciente que tiene cáncer, evaluando una muestra de paciente, en el que la muestra se caracteriza por i) un bajo nivel de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia o ii) un alto nivel de la expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia; y administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina.

30 Muestra de paciente

Los términos "muestra de paciente", "muestra de sujeto" y "muestra" se usan indistintamente aquí. La muestra del paciente puede ser un tejido, un fluido corporal o un producto corporal. Las muestras de tejido pueden incluir muestras fijas, incluidas en parafina, frescas o congeladas. Por ejemplo, la muestra de tejido puede incluir una biopsia, frotis de mejilla. Los tejidos de ejemplo incluyen pulmón, mama, cerebro, tejido nervioso, riñón, ovario, tiroides, páncreas, colon, próstata, ganglios linfáticos, piel, folículos pilosos y uñas. Las muestras de ejemplo incluyen muestras derivadas de tumores sólidos. Los fluidos corporales de ejemplo incluyen sangre, plasma, orina, linfa, lágrimas, sudor, saliva, semen y líquido cefalorraquídeo. Los productos corporales de ejemplo incluyen el aliento exhalado.

40 El tejido, fluido o producto se pueden extraer del paciente y analizar. La evaluación puede incluir uno o más de: realizar el análisis del tejido, fluido o producto; solicitando análisis del fluido tisular o producto; solicitar resultados del análisis del tejido, fluido o producto; o recibir los resultados del análisis del tejido, fluido o producto.

45 La muestra de tejido, fluido o producto puede analizarse para determinar el nivel de expresión de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa. La muestra de tejido, fluido o producto puede analizarse para determinar el nivel de expresión de una proteína descrita aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa. La muestra de tejido, fluido o producto puede analizarse adicionalmente para determinar el nivel de expresión génica de un gen o la pluralidad de genes de una vía de señalización preseleccionada o una vía fenotípica, por ejemplo, la vía de transición epitelial a mesenquimal, la vía de la E-cadherina, la vía de la vimentina, o la vía de la piruvato carboxilasa. La muestra de tejido, fluido o producto puede analizarse adicionalmente para determinar el nivel de expresión de proteína de una proteína o la pluralidad de proteínas de una vía de señalización preseleccionada o fenotípica, por ejemplo, la vía de transición epitelial a mesenquimal, vía de E-cadherina, vía de vimentina o la vía de la piruvato carboxilasa.

55 Métodos de evaluación de muestras y/o sujetos

Esta sección proporciona métodos para analizar muestras y analizar pacientes.

60 El nivel de expresión de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa; puede evaluarse utilizando cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de una molécula transcrita, gen, proteína, ARNm, ADN genómico o ADNc. La expresión génica puede medirse o controlarse mediante la medición de una transcripción génica, por ejemplo, un ARNm, mediante una medida de la cantidad de una proteína traducida, o mediante una medida de la actividad del producto génico; cualquiera de los cuales puede medirse usando técnicas estándar conocidas por una persona experimentada en la técnica. Los ejemplos no limitativos de tales métodos incluyen métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de

transcripción inversa de ácidos nucleicos, métodos de amplificación de ácidos nucleicos, métodos inmunológicos para la detección de proteínas, métodos de purificación de proteínas, función de proteínas o ensayos de actividad.

E-cadherina

5 El gen de la E-cadherina se encuentra en el cromosoma 16 humano. La E-cadherina es una cadherina clásica de la superfamilia de las cadherinas. La proteína E-cadherina codificada es una glucoproteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio que consta de cinco repeticiones extracelulares de cadherina, una región transmembrana y una cola citoplasmática altamente conservada. Las mutaciones en este gen se han correlacionado con el cáncer, incluidos los cánceres gástricos, de mama, colorrectales, de tiroides y ováricos. Se considera que la pérdida de la función de la E-cadherina contribuye a la progresión del cáncer al aumentar la proliferación, invasión y/o metástasis. El ectodominio de esta proteína media la adhesión bacteriana a células de mamíferos y el dominio citoplasmático se requiere para la internalización. Las variantes identificadas del transcrito de E-cadherina surgen de la mutación en los sitios de empalme de consenso.

Vimentina

20 El gen vimentina se encuentra en el cromosoma humano 10 y codifica un miembro de la familia de proteínas de filamentos intermedios. Los filamentos intermedios, junto con los microtúbulos y los microfilamentos de actina, forman el citoesqueleto celular, que ayuda a mantener la forma de las células y la integridad del citoplasma, así como a la estabilización de las interacciones del citoesqueleto. La vimentina también funciona en la mediación de las respuestas inmunitarias, el control del transporte de colesterol derivado de lipoproteínas de baja densidad de los lisosomas a los sitios de esterificación y como organizador de varias proteínas críticas involucradas en la unión, migración y señalización celular.

Piruvato Carboxilasa (PC)

30 El gen de PC se encuentra en los cromosomas humanos 11 y codifica la proteína piruvato carboxilasa, que cataliza la carboxilación de piruvato a oxaloacetato. La enzima activa es un homotetrámero dispuesto en un tetraedro que se encuentra exclusivamente en la matriz mitocondrial. La piruvato carboxilasa está involucrada en múltiples procesos celulares que incluyen la gluconeogénesis, la lipogénesis, la secreción de insulina y la síntesis del neurotransmisor glutamato. Las mutaciones en este gen se han asociado con la deficiencia de piruvato carboxilasa. Alternativamente, se han identificado variantes de transcrito empalmadas con diferentes 5' UTRs, pero que codifican la misma proteína.

Moléculas de ácido nucleico

40 Los métodos descritos aquí pueden referirse a la evaluación de una muestra para la expresión de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa; con base en ácidos nucleicos aislados que corresponden al gen descrito aquí, por ejemplo, el nivel de ARNm de E-cadherina; el nivel de ARNm de vimentina; el nivel de ARNm de piruvato carboxilasa. Como se usa aquí, el término "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generado usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena simple o de cadena doble.

50 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico "aislada" puede estar libre de secuencias (tales como secuencias que codifican proteínas) que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como ARNm, puede estar sustancialmente libre de otro material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejidos de la que se deriva el ácido nucleico.

55 Una molécula de ácido nucleico descrita aquí puede aislarse usando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia disponible en registros de bases de datos conocidas por las personas experimentadas en la técnica. Utilizando toda o una parte de tales secuencias de ácido nucleico, las moléculas de ácido nucleico descritas aquí pueden aislarse usando técnicas de hibridación y clonación estándar (por ejemplo, como se describe en Sambrook et al., Ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

60 Una molécula de ácido nucleico descrita aquí puede amplificarse utilizando ADNc, ARNm o ADN genómico como molde y cebadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con las técnicas estándar de amplificación por PCR. Las moléculas de ácido nucleico así amplificadas pueden clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a la totalidad o una porción de una molécula de ácido nucleico pueden prepararse mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automatizado.

Una molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico correspondiente al gen descrito aquí, o a la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica una proteína que corresponde al gen descrito aquí. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos dada es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos dada que puede hibridar con la secuencia de nucleótidos dada formando así un dúplex estable.

Una molécula de ácido nucleico descrita aquí puede comprender solo una parte de una secuencia de ácido nucleico. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden usar, por ejemplo, como una sonda o cebador. La sonda/cebador puede ser uno o más oligonucleótidos sustancialmente purificados. Las sondas con base en la secuencia de las moléculas de ácido nucleico descritas aquí pueden usarse para detectar transcritos o secuencias genómicas correspondientes a los genes descritos aquí. La sonda puede contener un grupo marcador, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Tales sondas se pueden usar como parte de un kit de prueba de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan la proteína, tal como midiendo niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína en una muestra de células de un paciente, por ejemplo, detectando niveles de ARNm.

Métodos para la detección de la expresión génica

Los métodos para detectar y/o cuantificar una transcripción génica, por ejemplo, el ARNm o el ADNc elaborado a partir del mismo, pueden incluir, pero no se limita a, análisis de inmunoprecipitación Southern, análisis de inmunoprecipitación Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y matrices de sondas. Los métodos para detectar y/o cuantificar una transcripción génica, por ejemplo, ARNm o ADNc hecho a partir de los mismos, pueden incluir, pero no se limita a, métodos con base en hibridación, por ejemplo, hibridación con una sonda que es específica para la transcripción génica, por ejemplo, ARNm o ADNc elaborado a partir de los mismos. El nivel de una transcripción génica, por ejemplo, ARNm o ADNc elaborada a partir de las mismas, se puede ensayar aplicando la muestra, o el ARNm o ADNc obtenido a partir de la misma, o amplificada de; a una micromatriz de ácido nucleico, o matriz de chip.

El nivel de una transcripción génica, por ejemplo, ARNm o ADNc elaborada a partir de las mismas, puede ensayarse mediante un método con base en la reacción en cadena de polimerasa (PCR), por ejemplo, PCR cuantitativa, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, PCR de transcripción inversa en tiempo real. El nivel de una transcripción génica, por ejemplo, ARNm o ADNc producido a partir de la misma, se puede ensayar mediante un método con base en secuenciación, por ejemplo, secuenciación cuantitativa de ARN.

El nivel de una transcripción génica, por ejemplo, ARNm, se puede determinar mediante métodos in situ o in vitro conocidos en la técnica. Para métodos in vitro, cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione contra el aislamiento de ARNm puede utilizarse para la purificación de ARN de una muestra, por ejemplo, de células de una muestra (véase, por ejemplo, Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999). Adicionalmente, se pueden procesar fácilmente grandes cantidades de muestras de tejido usando técnicas bien conocidas por las personas experimentadas en la técnica, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN en una sola etapa de Chomczynski (1989, Patente de los Estados Unidos No. 4,843,155). Para los métodos in situ, el ARNm no necesita ser aislado de las células antes de la detección. En tales métodos, una muestra de célula o tejido puede prepararse/procesarse usando métodos histológicos conocidos. La muestra puede inmovilizarse luego en un soporte, y luego ponerse en contacto con una sonda que puede hibridar con ARNm que codifica la transcripción del gen de interés.

Las determinaciones pueden ser a base del nivel de expresión absoluto; nivel de expresión normalizado, o nivel de expresión relativo; de una transcripción génica, por ejemplo, ARNm. Los niveles de expresión se pueden normalizar corrigiendo el nivel de expresión absoluto de una transcripción génica comparando su nivel de expresión con el nivel de expresión de otro gen que se expresa de forma estable, por ejemplo, un gen constitutivo que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes constitutivos tales como el gen de la histona H3 o el gen de la actina. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra con otra muestra, por ejemplo, una primera muestra tomada de un paciente a una segunda muestra tomada del mismo paciente, por ejemplo, de otro tejido o en un punto de tiempo diferente; o entre muestras de diferentes fuentes, por ejemplo, una muestra de paciente de un paciente a una muestra de paciente de otro paciente.

El nivel de expresión se puede proporcionar como un nivel de expresión relativo. El nivel de expresión relativo se puede determinar comparando el nivel absoluto de expresión de la transcripción génica, por ejemplo, ARNm, a un estándar de referencia. El estándar de referencia puede incluir el nivel de expresión de la transcripción génica de interés en una muestra genotípica o fenotípicamente definida. El estándar de referencia puede incluir el nivel de expresión de la transcripción génica de interés, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa, en una célula caracterizada genotípica o fenotípicamente como una célula epitelial. Una célula epitelial se puede caracterizar como en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21(suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).

El nivel de expresión de una transcripción génica descrita aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa, se puede medir al menos en dos puntos temporales para determinar si se ha producido un cambio en el nivel de expresión. Por ejemplo, el nivel de expresión puede medirse antes y después del tratamiento con un agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor de la enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina o agente quimioterapéutico, o tratamiento contra el cáncer, o en uno o más puntos de tiempo mientras el tratamiento con un agente terapéutico está en curso. Si se encuentra que el nivel de expresión disminuye, por ejemplo, disminuye la expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia y/o una expresión aumentada de vimentina en comparación con un estándar de referencia; al sujeto se le puede administrar el tratamiento con un inhibidor de la enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina. El estándar de referencia puede ser el nivel de expresión de la transcripción génica de interés en una célula epitelial caracterizada. Una célula epitelial puede caracterizarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) Clin Cancer Res 11:24; Savagner et al., (2010) Ann Oncol. 21 (suppl 7): vii89; Thierry et al., (2002) Nature Reviews Cancer 2(6):442).

15 **Proteínas**

Los métodos descritos aquí pueden referirse a la evaluación de una muestra para la expresión de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa; con base en proteínas aisladas que corresponden al gen descrito aquí, por ejemplo, el nivel de proteína de E-cadherina; el nivel de proteína de vimentina; el nivel de proteína de piruvato carboxilasa. Esto también puede incluir la evaluación de porciones biológicamente activas, variantes, isoformas o variantes de empalme de estas. El polipéptido nativo correspondiente a la proteína de interés puede aislarse de la muestra mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas estándar conocidas por las personas experimentadas en la técnica.

Una proteína "aislada" o "purificada" o una porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejidos de la que se deriva la proteína. El lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla. Las porciones biológicamente activas de un polipéptido pueden incluir polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa y exhiben al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína correspondiente.

35 **Métodos para la detección de la expresión de proteínas**

El nivel de expresión de una proteína o polipéptido puede detectarse y cuantificarse por cualquiera de una serie de medios bien conocidos por las personas experimentadas en la técnica. Los métodos para detectar y/o cuantificar una proteína o polipéptido descritos aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa; puede incluir, pero no se limita a, métodos bioquímicos como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión y similares, o diversos inmunoensayos como reacciones de precipitina en fluidos o en gel, inmunodifusión (simple o doble), inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs), ensayos de inmunofluorescencia, inmunoprecipitación Western, inmunohistoquímica, hibridación in situ, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y similares. Una persona experimentada en la técnica puede adaptar fácilmente métodos de detección de proteína/anticuerpo conocidos para su uso en la determinación de si las células expresan la proteína o polipéptido descrito aquí.

Una proteína o un polipéptido se puede detectar usando un inmunoensayo. Como se usa aquí, los inmunoensayos incluyen ensayos que utilizan un anticuerpo para enlazarse específicamente a una proteína o polipéptido. Un inmunoensayo se puede caracterizar por la detección del enlace específico de una proteína o polipéptido a un anticuerpo, en oposición al uso de otras propiedades físicas o químicas para aislar, dirigir y cuantificar el polipéptido. El polipéptido se puede detectar y/o cuantificar usando cualquiera de una serie de ensayos de enlace inmunológico bien reconocidos (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos números 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288 y 4,837,168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, ver también Asai (1993) Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) Basic and Clinical Immunology 7th Edition. Los inmunoensayos para la detección y/o cuantificación de una proteína o polipéptido pueden tomar una amplia variedad de formatos bien conocidos por las personas experimentadas en la técnica.

Se puede usar un anticuerpo capaz de enlazarse a una proteína o polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo con un marcador detectable (ya sea marcado directa o indirectamente), correspondiente a una proteína o polipéptido descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa, se puede usar para detectar la proteína o polipéptido. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo, por ejemplo, Fab o F(ab')₂. El término "marcado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende abarcar el marcado directo de la sonda o el anticuerpo mediante acoplamiento, es decir, unir físicamente una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por

reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcaje final de una sonda de ADN con biotina, de manera que se puede detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia.

5 El anticuerpo también puede marcarse, por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima. Un derivado de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par de proteína-ligando, por ejemplo, biotina-estreptavidina, o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de cadena simple, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc., que se enlaza específicamente con una proteína descrita aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, 10 piruvato carboxilasa, tal como la proteína codificada por el marco de lectura abierto correspondiente a la transcripción génica de una proteína o polipéptido descrito aquí, por ejemplo, se utiliza E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa o una proteína o polipéptido que ha sufrido la totalidad o una parte de su modificación postraduccion normal.

15 Las proteínas de las células se pueden aislar usando técnicas que son bien conocidas por las personas experimentadas en la técnica. Los métodos de aislamiento de proteínas empleados pueden ser, por ejemplo, los descritos en Harlow y Lane (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

20 El nivel de expresión se puede proporcionar como un nivel de expresión relativo. El nivel de expresión relativo puede determinarse comparando el nivel absoluto de expresión de la proteína, con un estándar de referencia. El estándar de referencia puede incluir el nivel de expresión de la proteína de interés en una muestra genotípica o fenotípicamente definida. El estándar de referencia puede ser el nivel de expresión de la proteína de interés, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa, en una célula caracterizada genotípica o fenotípicamente 25 como una célula epitelial. Una célula epitelial puede caracterizarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en una cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) *Clin Cancer Res* 11:24; Savagner et al., (2010) *Ann Oncol.* 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) *Nature Reviews Cancer* 2(6):442).

30 El nivel de expresión de una proteína o polipéptido descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa, se puede medir al menos en dos puntos de tiempo para determinar si se ha producido un cambio en el nivel de expresión. Por ejemplo, el nivel de expresión se puede medir antes y después del tratamiento con un agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor de la enzima que utiliza la glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina o agente quimioterapéutico, o tratamiento contra el cáncer, o en uno o más puntos de tiempo mientras el tratamiento con un agente terapéutico está en curso. Si se encuentra que el nivel de expresión está 35 disminuido, por ejemplo, una expresión disminuida de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia y/o una mayor expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia; al sujeto se le puede administrar un tratamiento con un inhibidor de la enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina.

40 Cánceres

Los métodos descritos aquí pueden usarse con cualquier cáncer, por ejemplo, los descritos por el Instituto Nacional del Cáncer. Se puede evaluar un cáncer para determinar si está utilizando un método descrito aquí. Los cánceres de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no 45 pequeñas; cáncer de mama; o carcinoma hepatocelular, osteosarcoma, lipomas, condrosarcoma o mesotelioma.

El cáncer puede ser un tumor primario, es decir, localizado en el sitio anatómico del inicio del crecimiento tumoral. El cáncer también puede ser metastásico, es decir, que presenta al menos un segundo sitio anatómico distinto del sitio anatómico de iniciación del crecimiento tumoral. El cáncer puede ser un cáncer recurrente, es decir, un cáncer que 50 regresa después del tratamiento, y después de un período de tiempo en el que el cáncer fue indetectable. El cáncer recurrente puede localizarse anatómicamente localmente al tumor original, por ejemplo, anatómicamente cerca del tumor original; regionalmente al tumor original, por ejemplo, en un ganglio linfático localizado cerca del tumor original; o distante al tumor original, por ejemplo, anatómicamente en una región remota del tumor original.

55 Inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina

Los métodos descritos aquí pueden incluir métodos para administrar un inhibidor de la enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina para el tratamiento del cáncer, como el cáncer de pulmón (por ejemplo, el cáncer de pulmón de células no pequeñas), el cáncer de mama, o carcinoma hepatocelular. 60

GLS1 es una amidohidrolasa activada con fosfato que cataliza la hidrólisis de glutamina a glutamato y amoníaco. La proteína está altamente expresada en el cerebro y el riñón, y juega un papel esencial en la generación de energía para el metabolismo, la síntesis del neurotransmisor glutamato del cerebro y el mantenimiento del equilibrio ácido-base en el riñón. El empalme alternativo da como resultado múltiples variantes de transcripción, incluida la GLS1 65 canónica (también conocida como KGA) y GAC. La GLS1 no está constantemente mutada o amplificada en cánceres. Sin embargo, la expresión del gen GLS1 puede estar sobreexpresada durante la tumorigénesis.

GLS2 es una glutaminasa activada por fosfato que cataliza la hidrólisis de glutamina a cantidades estequiométricas de glutamato y amoniaco. GLS2 promueve la respiración mitocondrial y aumenta la generación de ATP en las células al catalizar la síntesis de glutamato y alfa-cetoglutarato. GLS2 también aumenta la función antioxidante celular mediante la producción de NADH y glutatión.

El agente que agota la glutamina puede incluir, pero no se limita a, una asparaginasa (como Elspar® (Merck), Oncaspar® (Sigma Tau/Enzon) y Erwinaze® (EUSA)), una glutaminasa que incluye formas pegiladas (tales como las descritas en los documentos US7,052,689 y US6,312,939) o GlutaDon (como se describe en el documento US2009/0169537).

El inhibidor de la glutaminasa (GLS) puede incluir, pero no se limita a, bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro (BPTES). En algunas realizaciones, los inhibidores de GLS son como se describen en los documentos US6,451,828; WO2010/111504 (US2012/0220610); WO2012/034123; WO2011/143160; US5,552,427 y WO2010/033871. En algunas realizaciones, el inhibidor de la enzima que utiliza glutamina es como se describe en el documento US7,714,007, como un inhibidor de amidotransferasa, ácido graso de cadena larga, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), N-etilmaleimida (NEM), p-cloromercurifenilsulfonato (pCMPS), ácido L-2-amino-4-oxo-5-cloropentóico, DON más o-carbamoil-L-serina, acivicina [(alfaS,5S)-alfa-amino-3-cloro-4,5-dihidro-5-ácido isoxazoleacético], azaserina, palmitoil coenzima A (CoA), estearoil CoA, azul de bromotimol y dicoumarol.

Un inhibidor de GLS puede incluir, pero no se limita a, un inhibidor de GLS de molécula pequeña, un inhibidor de GLS con base en anticuerpo; un inhibidor de GLS con base en ácido nucleico, por ejemplo, un ARNm, un ARNsh, etc; o un agente que inhibe la interacción de GLS con otras proteínas. Un ejemplo de inhibidor de GLS es BPTES (bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro).

Administración

Los métodos descritos aquí pueden incluir métodos para administrar un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina para el tratamiento del cáncer. Un ejemplo de un inhibidor de la enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) es el BPTES (bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro). Los métodos descritos aquí pueden incluir además la selección de un régimen, por ejemplo, dosificación, formulación, vía de administración, número de dosificaciones, o terapias complementarias o combinadas del inhibidor de GLS. La administración del inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina puede responder a la adquisición de una evaluación del nivel de expresión de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa y/o clasificación de un paciente como candidato o no candidato para el tratamiento con un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina. Los métodos descritos aquí pueden incluir además la administración del régimen seleccionado. La administración puede proporcionarse en respuesta a la adquisición de conocimientos o información de una evaluación del nivel de expresión de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa, de otra parte; o recibir comunicación de una evaluación del nivel de expresión de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa, en el que la adquisición surge de la colaboración con otra parte.

El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina puede administrarse a un paciente usando cualquier cantidad eficaz y cualquier ruta de administración efectiva. La dosificación exacta requerida variará de un paciente a otro, dependiendo de factores específicos del paciente, por ejemplo, la edad y el estado general del paciente, tratamientos concurrentes, enfermedades o afecciones concurrentes; factores específicos del cáncer, por ejemplo, el tipo de cáncer, si el cáncer es recurrente, si el cáncer es metastásico, la gravedad de la enfermedad; y factores específicos del agente, por ejemplo, su composición, su modo de administración, su modo de actividad y similares. Por ejemplo, la dosificación puede variar dependiendo de si el paciente está recibiendo actualmente o ha recibido previamente un régimen de tratamiento antes de la administración de un tratamiento contra el cáncer; si el paciente no responde a dicho tratamiento actual o anterior; si el cáncer del paciente es recurrente; o si el cáncer del paciente ha hecho metástasis a un segundo sitio de tejido.

El uso diario total de un tratamiento contra el cáncer puede ser decidido por un médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el tipo de cáncer que se está tratando; la gravedad del cáncer; el estado metastásico del cáncer; el estado de recurrencia del cáncer; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la rata de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y como factores bien conocidos en las artes médicas.

El tratamiento del cáncer se puede administrar por cualquier ruta, incluso por aquellas rutas actualmente aceptadas y aprobadas para productos conocidos. Las rutas de administración de ejemplo incluyen, por ejemplo, oral, intraventricular, transdérmica, rectal, intravaginal, tópica (por ejemplo, en polvo, pomadas, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosa, nasal, bucal, enteral, vítea, sublingual; por instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o

inhalación; como un aspersor oral, aspersor nasal y/o aerosol, y/o a través de un catéter en la vena porta. Se puede administrar un agente de una manera que permita que el agente cruce la barrera hematoencefálica, la barrera vascular u otra barrera epitelial. Otras rutas de ejemplo incluyen la administración por un modo parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). Las frases "administración parenteral" y "administrada parenteralmente" como se usan aquí significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, generalmente por inyección e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intramedular, intratumoral, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una variedad de formas diferentes, tales como formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y administradas por infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida puede depender del modo de administración deseado y la aplicación terapéutica. Se puede administrar en diversos horarios de dosificación, una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe o elimina las células mesenquimáticas asociadas al cáncer, las células cancerosas que inician un tumor o las células madre del cáncer. El horario de dosificación dependerá de varios factores, incluido el tipo de cáncer que se trata; la severidad del cáncer; el estado metastásico del cáncer; el estado de recurrencia del cáncer; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y la rata de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Los horarios de dosificación de ejemplo pueden incluir, una vez al día, una vez a la semana, o una vez al mes, o una vez cada mes de por medio. La composición se puede administrar dos veces por semana o dos veces por mes, o una vez cada dos, tres o cuatro semanas. La composición se puede administrar en dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados durante todo el día o incluso usando infusión continua o administración a través de una formulación de liberación controlada. En ese caso, el agente terapéutico contenido en cada subdosis puede ser correspondientemente más pequeño para lograr la dosificación diaria total. La dosificación también puede combinarse para su administración durante varios días, por ejemplo, utilizando una formulación de liberación sostenida convencional, que proporciona una liberación sostenida del agente durante un período de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en la técnica y son particularmente útiles para la administración de agentes en un sitio particular.

Terapia de combinación

El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina, puede usarse en combinación con un agente terapéutico adicional. Por "en combinación con", no se pretende implicar que el inhibidor de la enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina y el agente terapéutico adicional se deben administrar al mismo tiempo y/o formularse para su administración conjunta, aunque estos métodos de administración están ciertamente dentro del alcance de los métodos descritos aquí. El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina puede administrarse simultáneamente, antes o después de, uno o más agentes terapéuticos adicionales. En general, el inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina y el agente terapéutico se administrarán a una dosis y/o en un horario de tiempo determinado para cada uno. Se apreciará además que el inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina y el agente terapéutico adicional utilizado en esta combinación pueden administrarse juntos en una única composición farmacéutica o administrarse por separado en diferentes composiciones farmacéuticas. La combinación particular que se empleará en un régimen tendrá en cuenta la compatibilidad del tratamiento del cáncer con el agente terapéutico adicional y/o el efecto terapéutico que se desea lograr.

El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina y el agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente. Por ejemplo, el inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina y el agente terapéutico adicional se administran al mismo tiempo; en el mismo día; o dentro del mismo régimen de tratamiento. El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina se puede administrar antes del agente terapéutico adicional, en el mismo día o dentro del mismo régimen de tratamiento. El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina puede administrarse simultáneamente con un agente terapéutico adicional durante un período de tiempo, después de lo cual se interrumpe el tratamiento con el agente terapéutico adicional y el tratamiento con el tratamiento contra el cáncer continua. El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina se puede administrar simultáneamente con el agente terapéutico adicional durante un período de tiempo, después del cual el inhibidor de una enzima que usa glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el tratamiento con el agente agotador de la glutamina se detiene y continúa el tratamiento con el agente terapéutico adicional. El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina y el agente

5 terapéutico adicional se puede administrar secuencialmente. Por ejemplo, el inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina se administra después de que ha cesado el régimen de tratamiento del agente terapéutico adicional; o el agente terapéutico adicional puede administrarse después de que haya cesado el régimen de tratamiento del inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina.

10 El inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina puede ser un tratamiento de primera línea para el cáncer, es decir, se usa en un paciente al que no se le ha administrado previamente otro fármaco destinado a tratar el cáncer; un tratamiento de segunda línea para el cáncer, es decir, se usa en un paciente al que se le haya administrado previamente otro fármaco destinado a tratar el cáncer; un tratamiento de tercera o cuarta línea para el cáncer, es decir, se usa en un paciente al que se le han administrado previamente dos o tres fármacos más para tratar el cáncer.

15 Agentes terapéuticos adicionales

20 Los agentes terapéuticos adicionales de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), por ejemplo, cetuximab, panitumumab, gefitinib, erlotinib, nimotuzamab, matuzamab, zalutumumab o lapatinib. La resistencia a los inhibidores de EGFR puede ocurrir como resultado de la transición de una célula a un fenotipo mesenquimatoso o un fenotipo mesenquimatoso, y los tumores con mutaciones de EGFR y el fenotipo mesenquimatoso pueden ser menos sensibles a los inhibidores de EGFR (ver, por ejemplo, Sequist et al., (2011) *Sci Transl Med.* 3:75. Buck et al., (2007) *Mol Cancer Ther.* 6: 532; Thomson et al., (2008) *Clin Exp Metastasis* 25: 843).

25 Kits y Productos

30 También se describen aquí kits y productos que comprenden un medio para ensayar el nivel de expresión génica de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa. Por ejemplo, el kit o producto puede incluir un agente capaz de interactuar con un producto de expresión génica de un gen descrito aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa. El kit o producto puede incluir una pluralidad de agentes capaces de interactuar con productos de expresión génica de una pluralidad de genes descritos aquí, por ejemplo, E-cadherina, vimentina, piruvato carboxilasa. El agente puede incluir, pero no está limitado a, un anticuerpo, una pluralidad de anticuerpos, un oligonucleótido, o una pluralidad de oligonucleótidos. El producto de expresión génica puede incluir, pero no se limita a, una molécula transcrita, una molécula de ARN, un polipéptido, una proteína, ADN genómico o ADNc.

35 El kit o producto puede incluir de manera adicional opcionalmente reactivos para realizar los ensayos descritos aquí. Por ejemplo, el kit puede incluir reguladores, disolventes, estabilizantes, conservantes, columnas de purificación, reactivos de detección y enzimas, que pueden ser necesarios para aislar ácidos nucleicos de una muestra del paciente, amplificar las muestras, por ejemplo, mediante qRT-PCR, y aplicar las muestras al agente descrito anteriormente; o para aislar proteínas de una muestra del sujeto, y aplicar las muestras al agente descrito anteriormente; o reactivos para aplicar directamente la muestra del sujeto al agente descrito anteriormente. Un kit también puede incluir muestras de control positivo y negativo, por ejemplo, muestras de ácido nucleico de control (por ejemplo, muestra de ácido nucleico de un sujeto sin cáncer, o una muestra de tejido no tumoral, o un sujeto que no ha recibido tratamiento para el cáncer, u otras muestras de prueba para analizar al mismo tiempo que las muestras de los sujetos. Un kit también puede incluir material de instrucción, que puede proporcionar una guía para la recolección y el procesamiento de muestras de pacientes, la aplicación de las muestras al nivel del ensayo de expresión génica y la interpretación de los resultados del ensayo.

40 Los componentes del kit se pueden proporcionar en cualquier forma, por ejemplo, líquida, seca, semiseca o en forma liofilizada, o en una forma para almacenamiento en una condición congelada. Típicamente, los componentes del kit se proporcionan en una forma que es estéril. Cuando se proporcionan reactivos en una solución líquida, la solución líquida generalmente es una solución acuosa, por ejemplo, una solución acuosa estéril. Cuando los reactivos se proporcionan en forma seca, la reconstitución generalmente se lleva a cabo mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, regulador estéril, se puede proporcionar opcionalmente en el kit.

45 El kit puede incluir uno o más recipientes para los componentes del kit en una concentración adecuada para su uso en el nivel de los ensayos de expresión génica o con instrucciones para la dilución para uso en el ensayo. El kit puede contener recipientes, divisores o compartimentos separados para los componentes del ensayo y el material informativo. Por ejemplo, las muestras de control positivas y negativas pueden estar contenidas en una botella o ampolla, el clasificador clínicamente compatible puede sellarse en una envoltura plástica estéril, y el material informativo puede estar contenido en un estuche o paquete de plástico. El kit puede incluir una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de recipientes individuales, conteniendo cada uno, una o más formas de unidades (por ejemplo, para usar con un ensayo) de un agente. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos y/o impermeables. El recipiente puede etiquetarse para su uso.

El kit puede incluir material informativo para realizar e interpretar el ensayo. El kit también puede proporcionar orientación sobre dónde informar los resultados del ensayo, por ejemplo, a un centro de tratamiento o proveedor de atención médica. El kit puede incluir formularios para informar los resultados de un ensayo de actividad génica descrito aquí, y dirección e información de contacto con respecto a dónde enviar dichos formularios u otra información relacionada; o una dirección URL (Localizador Uniforme de Recursos) para informar los resultados en una base de datos en línea o una aplicación en línea (por ejemplo, una aplicación). En otra realización, el material informativo puede incluir una guía con respecto a si un paciente debe recibir tratamiento con un agente de células madre contra el cáncer, dependiendo de los resultados del ensayo.

El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en material impreso, por ejemplo, un texto impreso, dibujo y/o fotografía, por ejemplo, una etiqueta o una hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, como material legible por computadora, grabación de video o grabación de audio. El material informativo del kit puede ser información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, sitio web o número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información sustantiva sobre el ensayo de actividad genética y/o su uso en los métodos descritos aquí. El material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

Se puede proporcionar una muestra de un sujeto a un proveedor de ensayo, por ejemplo, un proveedor de servicios (como un establecimiento de terceros) o un proveedor de atención médica que evalúa la muestra en un ensayo y proporciona una lectura. Por ejemplo, un proveedor de ensayo puede recibir una muestra de un sujeto, como una muestra de tejido o una muestra de plasma, sangre o suero, y evaluar la muestra usando un ensayo descrito aquí, y determina que el sujeto es un candidato para recibir tratamiento con un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina. El proveedor del ensayo puede informar a un proveedor de atención médica que el sujeto es candidato para el tratamiento con un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o un agente que agota la glutamina, y al candidato se le administra el inhibidor de una enzima que utiliza glutamina (por ejemplo, glutaminasa) o el agente que agota la glutamina. El proveedor del ensayo puede proporcionar los resultados de la evaluación y, opcionalmente, conclusiones con respecto a uno o más de los diagnósticos, pronósticos u opciones de terapia apropiadas para, por ejemplo, un proveedor de atención médica, o paciente, o compañía de seguros, en cualquier formato adecuado, como por correo o electrónicamente, o a través de una base de datos en línea. La información recopilada y proporcionada por el proveedor del ensayo se puede almacenar en una base de datos.

Ejemplos

Ejemplo 1. E-cadherina y vimentina se correlacionan de manera negativa y positiva, respectivamente, con la sensibilidad de BPTES en líneas celulares de cáncer de pulmón.

Un panel de 62 líneas celulares de cáncer de pulmón se cribó para determinar la sensibilidad al inhibidor de GLS, BPTES (bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro) (Tabla 1). De estos, 44 de las líneas celulares se han clasificado como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Aproximadamente el 30% de las 62 líneas mostraron una sensibilidad significativa a BPTES ($\mu/\mu_{\text{máx}} < 0,6$). La figura 1 muestra curvas de respuesta de crecimiento de tres líneas celulares de NSCLC (LXF-289; NCI-H1703; NCI-H460) a BPTES. Como se ejemplifica en la figura 1, hubo diferencias cualitativas en la sensibilidad de estas líneas celulares a BPTES. Durante el transcurso del ensayo de proliferación de 72 horas, algunas líneas celulares exhibieron predominantemente efectos citostáticos en respuesta a BPTES, por ejemplo, NCI-H1703, mientras que otras exhibieron muerte celular, por ejemplo, LXF289. Usando los datos de sensibilidad de BPTES en la Tabla 1, se buscaron marcadores de transcripción que asociaran sensibilidad o resistencia a BPTES utilizando conjuntos de datos disponibles públicamente. Las 200 sondas superiores mostraron la correlación más significativa con $\mu/\mu_{\text{máx}}$ sometida al análisis de la ruta de GeneGO (Figura 2). Ninguna vía relacionada con el metabolismo se asoció fuertemente con la respuesta de BPTES, lo que indica que cualquier diferencia intrínseca en el metabolismo entre células sensibles a BPTES y resistentes a BPTES no se refleja ampliamente a nivel transcripcional. Cuatro de las 25 vías transcripcionales/celulares superiores se relacionaron con la transición epitelio-mesenquimatoso (EMT) (rangos 1, 15, 23, 25 de la figura 2). La expresión de ARN a partir de este análisis indicó que la E-cadherina y la vimentina se correlacionaron negativa y positivamente con la sensibilidad, respectivamente. El análisis de inmunoprecipitación Western de un subconjunto de 20 de las líneas celulares de NSCLC indicó que había un patrón que corroboraba los niveles de proteína para estos marcadores de perfil transcripcional (figura 3A). En las 7 líneas celulares de NSCLC más sensibles, sin excepción, se observaron niveles bajos de E-cadherina y altos de proteína de vimentina (Figura 3B). La E-cadherina baja/vimentina alta son marcadores bien definidos de células que tienen un fenotipo mesenquimatoso como se caracteriza, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) *Cin Cancer Res* 11:24; Savagner et al., (2010) *Ann Oncol.* 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) *Nature Reviews Cancer* June vol 2:442).

ES 2 690 829 T3

Tabla 1. Panel de 62 líneas celulares de cáncer de pulmón cribadas para determinar la sensibilidad al inhibidor de GLS, BPTES.

Línea celular	$\mu/\mu\text{máx}$	Tejido: clasificación del cáncer
A427	-0,49	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
LXF-289	-0,25	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1734	-0,12	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
SW-1573	0,12	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1568	0,25	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1650	0,26	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1703	0,30	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H2030	0,37	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H661	0,43	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1299	0,49	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1581	0,51	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1618	0,53	Pulmón
NCI-H524	0,53	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
A549	0,53	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H774	0,54	Pulmón
NCI-H1770	0,56	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H2122	0,56	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
DMS-153	0,58	Pulmón
NCI-H23	0,60	Pulmón : cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1395	0,61	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H522	0,61	Pulmón
NCI-H1838	0,63	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
HCC15	0,64	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H209	0,64	Pulmón
NCI-H838	0,66	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H358	0,66	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1436	0,68	Pulmón
H2228	0,69	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
SW900	0,70	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1975	0,75	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H748	0,76	Pulmón
NCI-H1092	0,77	Pulmón
NCI-H1355	0,78	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1373	0,79	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H2107	0,79	Pulmón
NCI-H520	0,79	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.

ES 2 690 829 T3

Línea celular	$\mu/\mu\text{máx}$	Tejido: clasificación del cáncer
NCI-H1623	0,79	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1437	0,81	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
CALU-6	0,82	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H2170	0,82	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H446	0,84	Pulmón
NCI-H596	0,84	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
COR-L279	0,88	Pulmón
NCI-H2171	0,88	Pulmón
NCI-H1993	0,89	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H292	0,89	Pulmón
NCI-H82	0,90	Pulmón
NCI-H2347	0,90	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H2405	0,92	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1573	0,92	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H460	0,92	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1563	0,92	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
DMS-53	0,93	Pulmón
NCI-H1155	0,93	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1048	0,94	Pulmón
COR-L23	0,96	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H2009	0,96	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H2126	1,00	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H2081	1,00	Pulmón
NCI-H1651	1,00	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.
NCI-H1694	1,00	Pulmón
NCI-H1666	1,00	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Dos excepciones a la correlación entre el fenotipo mesenquimatoso y la sensibilidad a la inhibición de GLS fueron las líneas celulares NCI-H838 y NCI-H460 (Figura 3A). Las células NCI-H838 exhiben solo un nivel moderado de sensibilidad a BPTES a pesar de expresar E-cadherina baja/vimentina alta (Tabla 2, Figura 3A); sin embargo, estas células también expresan altos niveles de piruvato carboxilasa (PC) (Figura 3A). Se ha demostrado que la dependencia de glioma y células cancerosas hepatocelulares en la glutamina está modulada por la expresión de piruvato carboxilasa, ya que esta enzima permite la entrada de carbono en el TCA a través de un mecanismo independiente de glutamina (Gln). Aunque no sin excepción, los niveles bajos de proteína de piruvato carboxilasa también se correlacionaron bien con la sensibilidad a BPTES en el panel de líneas celulares examinadas (Figura 3A, B), lo que sugiere que modos alternativos de entrada de carbono en el TCA podrían modular potencialmente la dependencia de GLS.

5

10

Tabla 2. Sensibilidad de línea celular de NSCLC a BPTES y mutaciones genéticas de línea celular.

Línea celular	Tejido: clasificación del cáncer	$\mu/\mu_{\text{máx}}$ @10 μM	Estado de Mutación (COSMIC)
A427	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	-0,49	CDKN2A, CDKN2a.p14., CTNNB1, KRAS, SMARCA4, STK11
A549	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,53	CDKN2A, CDKN2a.p14., KRAS, SMARCA4, STK11
HCC15	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,64	
LXF-289	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	-0,25	CDKN2A, CTNNB1, TP53
NCI-H1395	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,61	BRAF, FLCN, STK11
NCI-H1437	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,81	CDKN2A, CDKN2a.p14., TP53
NCI-H1563	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,92	CDKN2A, CDKN2a.p14., STK11
NCI-H1568	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,25	
NCI-H1703	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,30	CDKN2A, TP53
NCI-H1975	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,75	CDKN2A, EGFR, PIK3CA, TP53
NCI-H2030	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,37	KRAS, SMARCA4, STK11, TP53
NCI-H2122	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,56	CDH1, CDKN2A, CDKN2a.p14., KRAS, STK11, TP53
NCI-H23	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,60	FGFR2, KRAS, SMARCA4, STK11, TP53
NCI-H358	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,66	KRAS
NCI-H460	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,92	CDKN2A, CDKN2a.p14., KRAS, PIK3CA, STK11
NCI-H520	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,79	CDKN2A, TP53
NCI-H522	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,61	TP53
NCI-H596	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,84	PIK3CA, RB1, TP53
NCI-H661	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,43	CDKN2A, SMARCA4, TP53
NCI-H838	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,66	CDKN2A, CDKN2a.p14., SMARCA4, STK11, TP53
SW-1573	Pulmón: cáncer de pulmón de células no pequeñas.	0,12	CDKN2A, CDKN2a.p14., CTNNB 1, KRAS, NF2, PIK3CA, SMAD4

5 Las tres líneas de NSCLC que fueron más sensibles a BPTES (A427, LXF289, SW1573) tienen todas mutaciones de activación en β -catenina (T41A en A427 y LXF289, T33F en A427, Tabla 3). La señalización de Wnt/ β -catenina es una de las varias vías que se han implicado en dirigir la EMT. Como resultado, se usó la anulación mediada por

ARNsi de β -catenina en células A427 para determinar si la pérdida de β -catenina mutada dio lugar a un cambio en la sensibilidad a BPTES.

Tabla 3: líneas celulares y estado mutacional correspondiente

Línea celular	Tejido	Máx Inh @ 10uM (%)	Mu/máx @10 uM	Estado de Mutación (COSMIC)
LXF-289	pulmón:nsclc	91	-0,25	CDKN2A, CTNNB1, TP53
NCI-H1703	pulmón:nsclc	87	0,30	CDKN2A, TP53
NCI-H2030	pulmón:nsclc	87	0,37	KRAS, SMARCA4, STK11, TP53
A427	pulmón:nsclc	86	-0,49	CDKN2A, CDKN2a.p14., CTNNB1, KRAS, SMARCA4, STK11
A549	pulmón:nsclc	73	0,53	CDKN2A, CDKN2a.p14., KRAS, SMARCA4, STK11
NCI-H661	pulmón:nsclc	73	0,43	CDKN2A, SMARCA4, TP53
SW-1573	pulmón:nsclc	68	0,12	CDKN2A, CDKN2a.p14., CTNNB1, KRAS, NF2, PIK3CA, SMAD4
NCI-H2122	pulmón:nsclc	58	0,56	CDH1, CDKN2A, CDKN2a.p14., KRAS, STK11, TP53
NCI-H1568	pulmón:nsclc	50	0,25	
NCI-H23	pulmón:nsclc	45	0,60	FGFR2, KRAS, SMARCA4, STK11, TP53
HCC15	pulmón:nsclc	40	0,64	
NCI-H522	pulmón:nsclc	39	0,61	TP53
NCI-H838	pulmón:nsclc	37	0,66	CDKN2A, CDKN2a.p14., SMARCA4, STK11, TP53
NCI-H1437	pulmón:nsclc	27	0,81	CDKN2A, CDKN2a.p14., TP53
NCI-H358	pulmón:nsclc	27	0,66	KRAS
NCI-H1975	pulmón:nsclc	18	0,75	CDKN2A, EGFR, PIK3CA, TP53
NCI-H460	pulmón:nsclc	18	0,92	CDKN2A, CDKN2a.p14., KRAS, PIK3CA, STK11
NCI-H1395	pulmón:nsclc	16	0,61	BRAF, FLCN, STK11
NCI-H520	lung:nsclc	14	0,79	CDKN2A, TP53
NCI-H596	pulmón:nsclc	13	0,84	PIK3CA, RB1, TP53
NCI-H1563	pulmón:nsclc	8	0,92	CDKN2A, CDKN2a.p14., STK11

5 Con el fin de comprender mejor la contribución del fenotipo mesenquimatoso versus epitelial a la dependencia de GLS, la línea celular NCI-H358 se trató con TGF β y se ensayó el fenotipo. La línea celular NCI-H358 es fenotípicamente epitelial (expresión de E-cadherina alta/vimentina baja, Figura 3), es relativamente insensible a BPTES (Figura 2), y se ha demostrado que experimenta EMT en respuesta al tratamiento con TGF β . El tratamiento de la línea NCI-H358 dio lugar a un cambio a un fenotipo mesenquimatoso con expresión baja de E-cadherina/alta vimentina (Figura 4A). Notablemente, además de las alteraciones en la expresión de E-cadherina/vimentina con EMT inducida por TGF β , los niveles de GAC también se alteraron con este tratamiento, con un aumento de 2 veces en los niveles de proteína en la variante mesenquimatoso (Figura 3A). A través del panel de 21 líneas celulares de NSCLC examinadas, se encontró similarmente que los niveles de GAC se elevaron 2 veces ($p=0,03$) a lo largo del grupo de líneas sensibles a BPTES en comparación con líneas insensibles (Figura 3A, B).

Ejemplo 2. E-cadherina y vimentina se correlacionan negativa y positivamente, respectivamente, con la sensibilidad a BPTES en líneas celulares de cáncer de mesotelioma.

Se cribó un panel de cinco líneas celulares de cáncer de mesotelioma para determinar la sensibilidad al inhibidor de GLS, BPTES (bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro) (Figura 5). La figura 5A muestra curvas de respuesta de crecimiento de cinco líneas celulares de cáncer de mesotelioma (H28; MSTO-211H; H2052; H226; H2452) tratadas con concentraciones variables del inhibidor de GLS, BPTES. La línea celular MET-5A es una línea celular de mesotelioma normal. La figura 5B muestra la inhibición del crecimiento en veces y del porcentaje promedio de inhibición de crecimiento de cinco líneas celulares de cáncer de mesotelioma (H28; MSTO-211H; H2052; H226; H2452) tratadas con 10 μ M del inhibidor de GLS, BPTES. La figura 5C representa un análisis de inmunoprecipitación Western de líneas celulares de cáncer de mesotelioma para niveles de proteína de GLS (glutaminasa 1 activada con fosfato), GAC y actina (control); en ausencia del inhibidor de GLS, BPTES (el panel superior de la figura es la señal de la proteína después de un breve tiempo de exposición en desarrollo y el panel central es la señal de la proteína después de un tiempo de exposición largo en desarrollo).

El análisis de inmunoprecipitación Western (Figura 6A) de las líneas celulares de cáncer de mesotelioma indicó la línea celular de cáncer de mesotelioma más sensible, NCI-H28 (Figura 6B), mostró E-cadherina baja; vimentina alta; y se observaron niveles bajos de proteína de piruvato carboxilasa (Figura 6A). La E-cadherina baja/vimentina alta son marcadores bien definidos de células que tienen un fenotipo mesenquimatoso como se caracteriza, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes referencias: (Yauch et al., (2005) *Cin Cancer Res* 11:24; Savagner et al., (2010) *Ann Oncol.* 21 (suppl 7): vii89; Thiery et al., (2002) *Nature Reviews Cancer* June vol 2:442).

Ejemplo 3. Dependencia en la actividad de GLS1, de líneas celulares de cáncer selectas

Se analizaron los efectos de la inhibición de GLS1 en el crecimiento de células tumorales utilizando un inhibidor publicado de GLS1, BPTES (Steven J. McBryant et al. *Biochem Journal* 406, 407(2007). El compuesto exhibe una IC_{50} de \sim 80 nM utilizando GLS1 humano purificado recombinante y enzimas GAC, que actúan como un inhibidor no competitivo de la enzima de longitud completa (McBryant Supra; B. DeLaBarre et al. *Biochemistry* 50, 10764 (2011)). Como se publicó anteriormente, BPTES no es un inhibidor eficaz de la isoforma GLS2 de la glutaminasa ($IC_{50} \sim$ 90 μ M). Además, el BPTES actúa de forma alostérica a través de un bolsillo de enlace ubicado en la interfase dímero-dímero del tetrámero GLS1 (A. Cassago et al., *Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism.* *Proc of the National Academy of Sciences* 109, 1092 (2012); McBryant Supra; DeLaBarre, Supra). Un componente principal del bolsillo de enlace es un bucle móvil (residuos 317-324 de GLS1) que se vuelve fijo tras el enlace de BPTES. Este bucle difiere en la secuencia primaria entre GLS1 y GLS2, explicando así la respuesta diferencial de las dos isoformas. BPTES se utilizó inicialmente para sondear un pequeño número de líneas celulares de cáncer de origen diverso para determinar si había algún efecto antiproliferativo significativo del compuesto in vitro. Se había informado que las líneas investigadas exhibían sensibilidad a la inhibición o anulación de GLS1 (MDA-MB-231, SKBR3, HCT116, PC3, HepG2), una que se describió como insensible (Huh7) y dos líneas para las cuales no había datos publicados disponibles en ese tiempo (A427, CAKI-1) (P. Gao et al. *Nature* 458, 762 (2009); J.-B. Wang et al. *Cancer Cell* 18, 207 (2010); F. Weinberg et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 8788 (2010); T. Cheng et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 8674 (2011)). Como se ve en la figura 8A, la expresión de GLS1 es altamente variable a lo largo de este panel, con los niveles más altos en células de carcinoma renal CAKI-1 y más bajos en la línea celular de cáncer de mama SKBR3. De manera interesante, la variante de empalme de GAC parece ser la forma de glutaminasa más altamente expresada en todas las líneas celulares que hemos analizado. Después de un tratamiento de 72 horas de cada línea celular con BPTES, se observó una amplia gama de sensibilidades al tratamiento. La respuesta máxima se observó en la línea A427 y el efecto mínimo se observó en las células SKBR3 (Figura 8B, Figura 8C). Las líneas celulares MDA-MB-231, HepG2 y CAKI-1 mostraron una sensibilidad modesta al tratamiento con BPTES, mientras que SKBR3, HCT116, HUH7 y PC3 mostraron una respuesta mínima al compuesto (Figura 8C). La evaluación del número de células por el contenido de ADN y el conteo directo de células demostró el mismo efecto del tratamiento con BPTES sobre la proliferación celular como lo indica CellTiter-Glo en el punto final de 72 horas (Figura 9).

Especificidad de BPTES, inhibidor de GLS1

BPTES se ha usado frecuentemente en la bibliografía para dilucidar las funciones biológicas de la glutaminasa (C. Yang et al. *Cancer Research* 69, 7986 (2009); M. J. Seltzer et al. *Cancer Research* 70, 8981 (2010); W. Liu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 8983 (Jun 5, 2012); P. A. Gameiro et al. *Cell Metab* 17, 372 (Mar 5, 2013)). Para confirmar que los efectos de BPTES en las células dependen específicamente de la inhibición de la actividad de GLS1, se realizaron experimentos para identificar los efectos de este compuesto dentro y fuera del objetivo. Se ha descrito previamente un mutante de punto doble de GAC, la variante de empalme de GLS1, denominada GAC-BR (F318A y F322A) que es resistente a la inhibición de BPTES mientras que mantiene su actividad catalítica B. DeLaBarre et al. *Biochemistry* 50, 10764 (2011)). Las células A427 y MDA-MB-231 sensibles a BPTES se volvieron resistentes mediante la sobreexpresión estable del mutante GAC-BR mientras que las células que expresan el vector vacío o GAC-WT conservaron sensibilidad significativa a BPTES (Figura 10A, Figura 11A). Los niveles de sobreexpresión del mutante GAC-WT y GAC-BR fueron aproximadamente 1,5-2,0 veces superiores a los niveles de GLS1 endógeno (Figura 12). Un análogo de BPTES bioquímicamente inactivo, el Compuesto I (Figura 7) se usó para tratar las mismas líneas celulares y no tuvo efecto antiproliferativo en ninguna de las líneas celulares (Figura

10B, Figura 11B). Estos datos indican que la actividad antiproliferativa de BPTES se debe a la inhibición de GLS1 y no a efectos fuera del objetivo.

5 Varios grupos han demostrado que la inhibición de GLS conduce a una disminución en los intermedios del ciclo del ácido tricarbóxico celular (TCA) corriente abajo de la actividad de GLS (P. Gao et al. Nature 458, 762 (2009); T. Cheng et al. Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 8674 (2011)). La medición de glutamato (el producto de la reacción de glutaminasa) y aspartato (que deriva tanto carbono y nitrógeno del glutamato) son lecturas particularmente sensibles de la actividad de glutaminasa (Figura 13). El carbono ¹³C marcado en células pretratadas con fármaco se rastreó durante 1 hora, seguido de un período de marcado ¹³C(5)-Gln de 2 horas, mediante LC/MS. En las células MDA-MB-231 y A427, la inhibición de GLS dio como resultado una acumulación disminuida de marca en glutamato y aspartato y estos efectos se rescataron mediante la introducción del mutante GAC-BR (Figuras 10C,D y Figura 11C,D). El Compuesto Inactivo I no tuvo efectos sobre el marcado con glutamato y aspartato en estas dos líneas (Figuras 10C,D y Figuras 11C,D). Estos datos indican que los efectos del tratamiento con BPTES en la síntesis de novo de glutamato y aspartato a partir de glutamina se deben a la inhibición específica de GLS1. Los aparentes efectos aparentes sobre el objetivo de BPTES en la línea celular A427 también sugieren que, aunque hay una expresión detectable de GLS2 en esta línea, la inhibición de GLS1 sola es suficiente para causar efectos antiproliferativos significativos y alterar el metabolismo de la glutamina.

20 Con el fin de obtener más información sobre los cambios metabólicos que podrían ser relevantes para la sensibilidad a la inhibición de GLS1, un panel diverso de 15 líneas celulares que incluyó representantes de NSCLC (NCI-H1703, A427, LXF289, NCI-H838, NCI-H460, NCI- H1563), carcinoma de células renales (786-0, SLR20, SLR21, SLR24, RCC4) y carcinoma de mama (MDA-MB-231, HS578T, HCC1395, SKBR3) fueron examinados. Los ensayos de proliferación se acoplaron con un análisis de metabolitos intracelulares objetivados en cada una de las líneas celulares. Si bien se observaron cambios claros en números celulares en múltiples líneas celulares con 72 horas de tratamiento farmacológico, se observó poco o ningún efecto del fármaco sobre los números celulares después de 24 horas (Figura 9). Como resultado, se realizaron ensayos para determinar los cambios en los metabolitos después de 24 horas de tratamiento farmacológico para medir los cambios en el metabolismo celular que ocurrieron antes de un bloqueo en la proliferación celular. La Tabla 3 indica los cambios en el metabolito que se correlacionaron con los efectos antiproliferativos de BPTES.

30

Tabla 3: Cambios en los metabolitos correlacionados con los efectos antiproliferativos de BPTES

Metabolito	correlación de Pearson	Valor de P	Valor de P ajustado
Trifosfato de adenosina	0,79	0,0002	0,03
Difosfato de adenosina	0,77	0,0004	0,03
Trifosfato de uridina	0,75	0,0009	0,05
Ácido L-glutámico	0,71	0,0020	0,05
Ácido fosfoenolpirúvico	0,71	0,0023	0,05
NADPH	0,70	0,0024	0,05
Ácido cítrico	0,70	0,0028	0,05
Glutaciona	0,69	0,0030	0,05
Ácido 3-fosfoglicérico	0,69	0,0034	0,05
Glutaciona oxidada	0,68	0,0035	0,05
NAD	0,68	0,0036	0,05
NADP	0,67	0,0046	0,06
6-Fosfato de glucosa	0,66	0,0056	0,07
Fosfoserina	0,62	0,0101	0,11
Ácido L-aspartico	0,62	0,0105	0,11
Ácido fumárico	0,78	0,0138	0,13
Ácido L-málico	0,60	0,0139	0,13
L-glutamina	-0,58	0,0178	0,15
Ácido D-2-hidroxi-glutámico	0,38	0,1411	1

Metabolito	correlación de Pearson	Valor de P	Valor de P ajustado
3-Fosfato de D-gliceraldehído	-0,38	0,1432	1
Ácido L-láctico	0,38	0,1463	1
Fosfato de dihidroxiacetona	-0,38	0,1490	1
1,6-Bisfosfato de fructosa	-0,36	0,1675	1
Ácido oxoglutárico	0,38	0,1825	1
5-Fosfato de D-ribosa	-0,33	0,2095	1
5-Fosfato de D-ribulosa	-0,29	0,2717	1
L-Prolina	0,26	0,3254	1
D-Glucosa	0,26	0,3317	1
Ácido pirúvico	0,27	0,3767	1
Ácido succínico	0,23	0,3814	1
NADH	0,44	0,3825	1
Ácido argininosuccínico	0,24	0,3947	1
6-Fosfato de fructosa	0,23	0,4015	1
Acetil-CoA	0,32	0,4427	1
Monofosfato de adenosina	0,19	0,4895	1
1-Fosfato de glucosa	0,09	0,7787	1
7-Fosfato de D-sedoheptulosa	0,02	0,9366	1

5 Notablemente, las disminuciones en los niveles intracelulares de glutamato y ATP se correlacionan bien con los efectos antiproliferativos de la inhibición de GLS1 a través de este panel de líneas celulares (correlación de Pearson de 0,71, $p=0,002$ y 0,79, $p=0,0002$, respectivamente). El glutamato puede actuar tanto como una fuente anaplerótica para el TCA y como un precursor para la generación de glutatión (P.S. Ward, C. B. Thompson, *Cancer Cell* 21, 297 (Mar 20, 2012)). Las células que usan glutamina y GLS1 como fuente primaria de glutamato intracelular fueron las más sensibles a la inhibición de GLS1. Las disminuciones en el ATP celular se correlacionaron con los efectos antiproliferativos del fármaco, lo que concuerda con la glutamina que apoya la producción de ATP a través del TCA y la fosforilación oxidativa (P. Gao et al. *Nature* 458, 762 (2009)). Si bien estas correlaciones son generalmente ciertas a través de estas líneas celulares, una población claramente sensible no es obvia desde este panel limitado de células (Figura 15).

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar a un paciente que tiene cáncer para el tratamiento con un inhibidor de la enzima que utiliza glutamina o un agente que agota la glutamina, comprendiendo el método:
- 10 evaluar una muestra de un paciente, en el que la muestra se evalúa para i) el nivel de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia o ii) el nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia; y
- 15 determinar tratar al paciente con el inhibidor de la enzima que utiliza glutamina o el agente que agota la glutamina si la muestra se caracteriza además por i) un bajo nivel de expresión de E-cadherina en comparación con un estándar de referencia y ii) un alto nivel de expresión de vimentina en comparación con un estándar de referencia.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que:
- la muestra se evalúa adicionalmente para determinar el nivel de expresión de piruvato carboxilasa en comparación con un estándar de referencia; y
- está determinado para tratar al paciente con el inhibidor de la enzima que utiliza glutamina o el agente que agota la glutamina si la muestra además se caracteriza por una expresión baja o disminuida de la piruvato carboxilasa en comparación con un estándar de referencia.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que:
- (a) el nivel de expresión de E-cadherina es al menos una disminución en la expresión de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia; y/o
- (b) el nivel de expresión de vimentina es un aumento de 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 veces en comparación con el estándar de referencia; y/o
- 30 (c) el nivel de expresión de E-cadherina se mide mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica E-cadherina; y/o
- (d) el nivel de expresión de vimentina se mide mediante la evaluación del nivel de ARN que codifica la vimentina; y/o
- 35 (e) el nivel de expresión de E-cadherina se evalúa por el nivel de expresión de la proteína E-cadherina; y/o
- (f) el nivel de expresión de vimentina se evalúa por el nivel de expresión de la proteína vimentina.
- 40 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paciente se evalúa para el tratamiento con un inhibidor de una enzima que utiliza glutamina.
- 45 5. El método de la reivindicación 4, en el que el inhibidor de una enzima que utiliza glutamina inhibe una glutaminasa.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la glutaminasa es GLS1 o glutaminasa C (GAC).
- 50 7. El método de la reivindicación 4, en el que el inhibidor es bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sulfuro (BPTES).
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paciente se evalúa para el tratamiento con un agente que agota la glutamina.
- 55 9. El método de la reivindicación 8, en el que el agente que agota la glutamina es una asparaginasa o una glutaminasa.
- 60 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el cáncer es cáncer de pulmón.
11. El método de la reivindicación 10, en el que el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células no pequeñas.

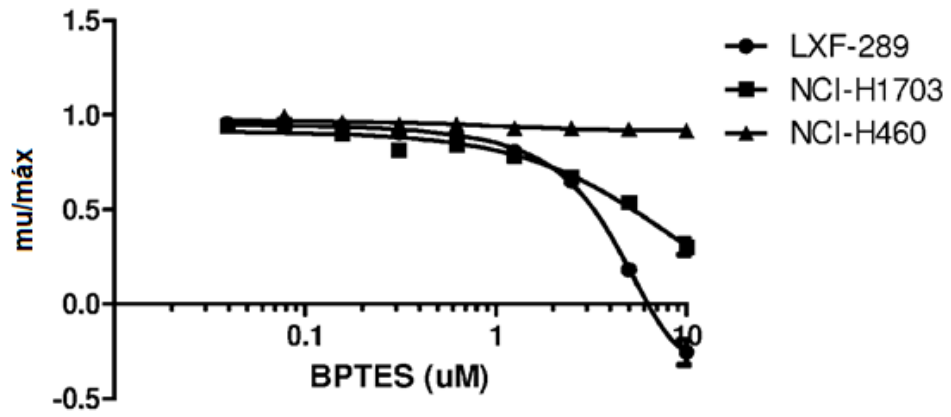


FIG. 1

Rango	Vía	Valor p	Proporción
1	Desarrollo_vía de señalización WNT. Parte 2	4.737E-07	7
2	Respuesta inmune_vía de señalización IL-1	2.706E-06	8
3	Respuesta inmune_señalización Murina NKG2D	3.820E-05	5
4	Respuesta inmune_señalización CD18 en células NK	3.829E-05	6
5	Respuesta inmune_Función de MEF2 en linfocitos T	8.982E-05	5
6	Respuesta inmune_NFAT en respuesta inmune	9.887E-05	6
7	Desarrollo_papel de HDAC y quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK) en control de miogénesis esquelética	1.303E-04	6
8	Respuesta inmune_vía Fc épsilon RI	1.423E-04	5
9	Desarrollo_Gastrina en crecimiento celular y proliferación	2.517E-04	5
10	Desarrollo_vía mediada por NOTCH1 para modulación de actividad NF-KB	2.517E-04	4
11	Señalización de proteína G_vía de señalización proteína G alfa-12	3.510E-04	4
12	Respuesta inmune_señalización humana NKG2D	3.896E-04	4
13	Respuesta inmune_señalización PIP3 en linfocitos B	5.745E-04	4
14	Desarrollo_señalización familia GDNF	8.146E-04	4
15	Desarrollo_inducción TGF-beta-dependiente de EMT vía MAPK	8.842E-04	4
16	Desarrollo_señalización VEGF vía VEGFR2 – cascadas genéricas	1.026E-03	5
17	Respuesta inmune_activación de IL-2 y vía de señalización	1.036E-03	4
18	Señalización de proteína G_comunicación entrecruzada entre GTPasas de familia Ras	1.170E-03	3
19	Respuesta inmune_señalización CD28	1.403E-03	4
20	Respuesta inmune_vía BCR	1.493E-03	4
21	Señalización de proteína G_vía de regulación Rap2B	1.712E-03	2
22	Respuesta inmune_vía de señalización TREM1	2.075E-03	4
23	Desarrollo_Regulación de transición epitelial a mesenquimatosa (EMT)	2.788E-03	4
24	Adhesión celular_Papel de CDK5 en adhesión celular	2.899E-03	2
25	EMT inducida por hipoxia en cáncer y fibrosis	2.899E-03	2

FIG. 2

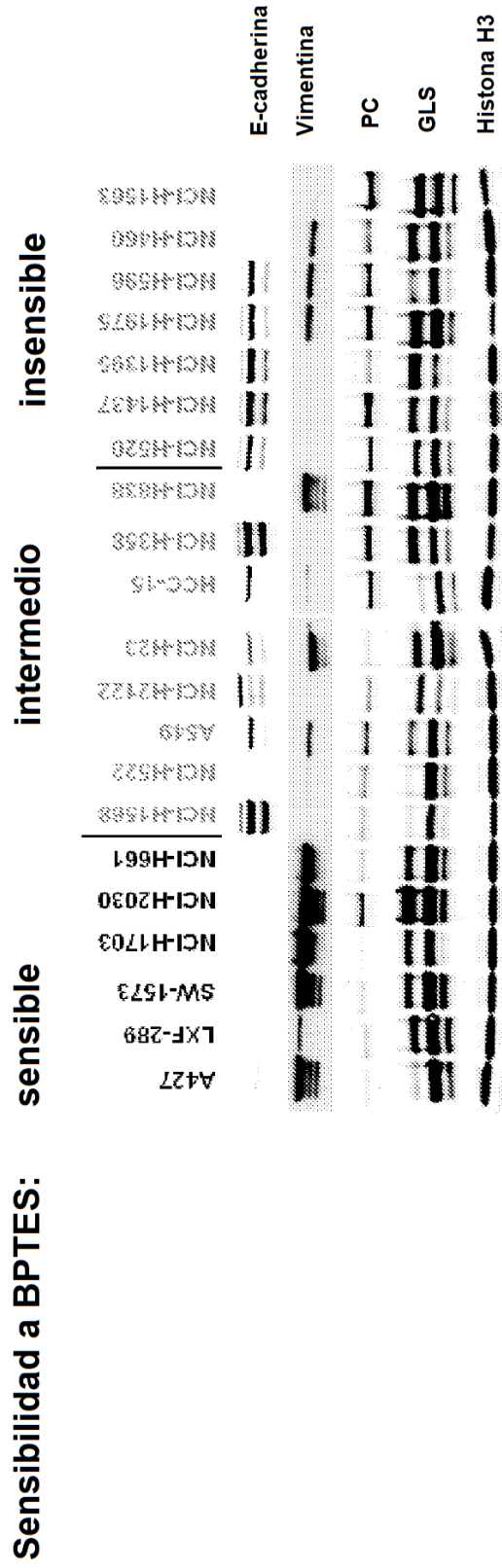


FIG. 3A

B

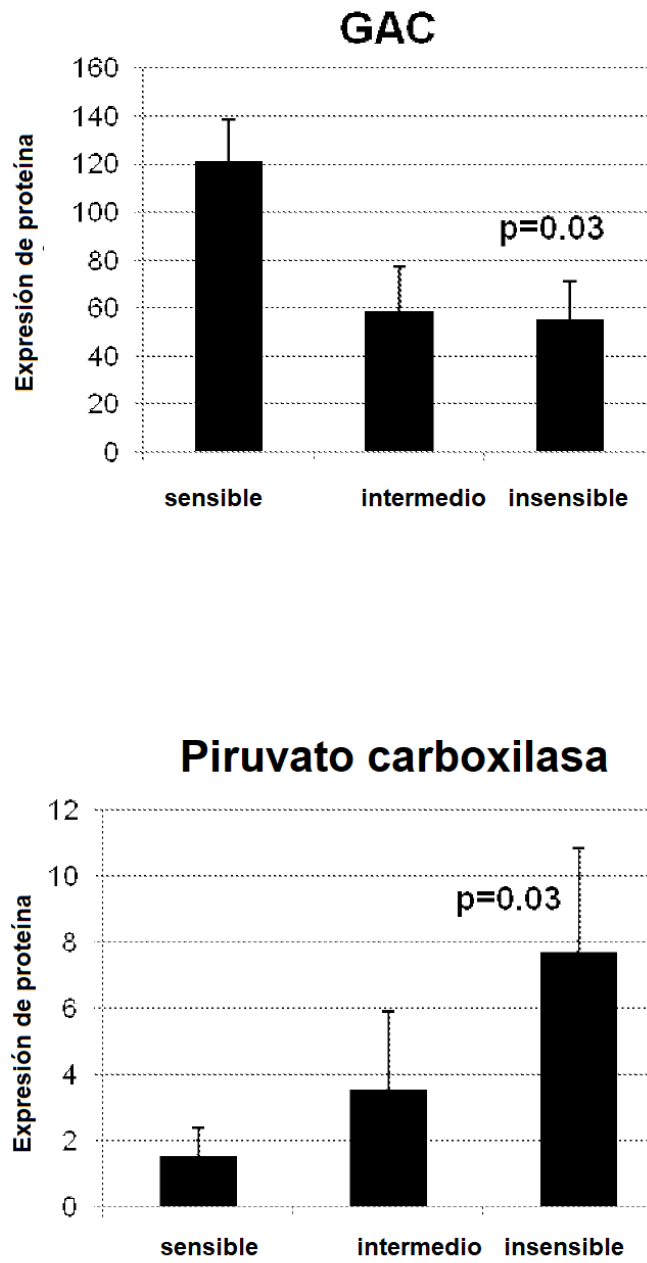
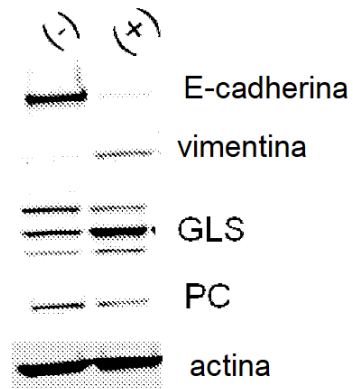


FIG. 3B

A



B

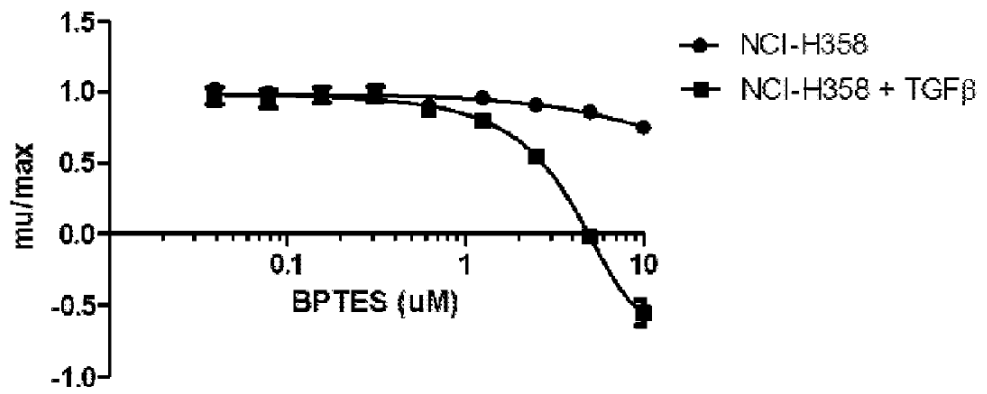


FIG. 4

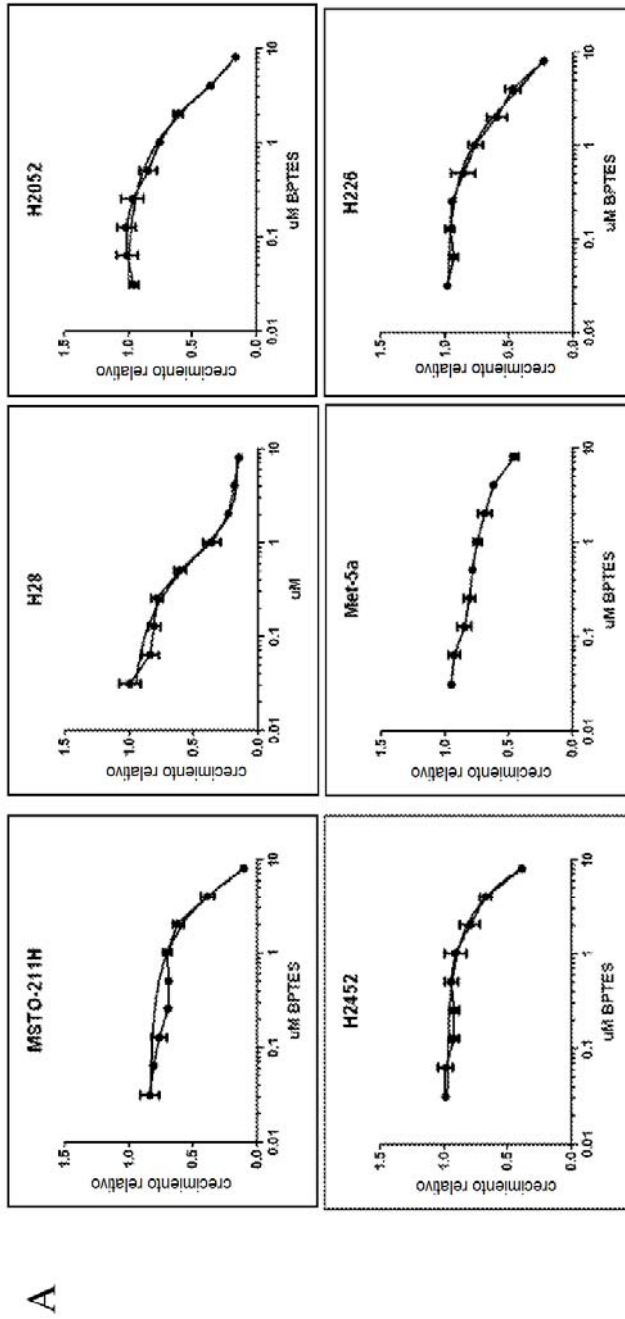
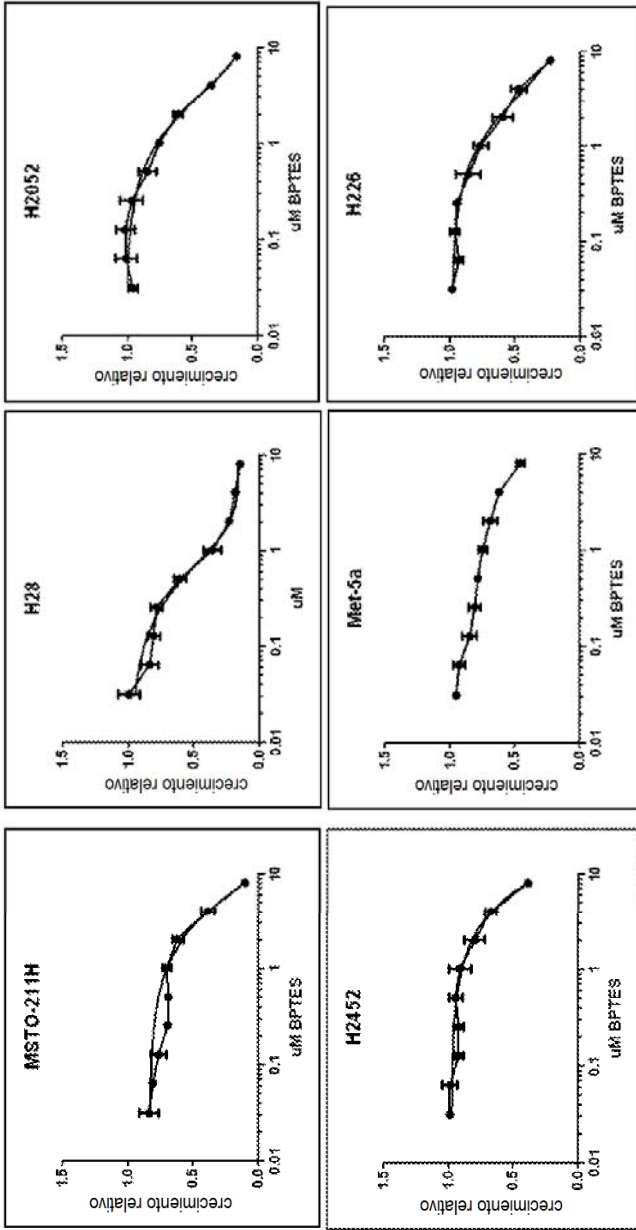


FIG. 5A-5B



A

Línea celular	Tipo de tejido	Veces de crecimiento	% promedio de inhibición @10μM	n
H28	meso	2.2	85.5	2
MSTO-211H	meso	3.7	79	4
H2052	meso	1.7	78	2
H226	meso	2.8	77	1
H2452	meso	2.0	55	2
Met-5A	Mesotelio SV40 transformado	3.9	41	2

B

FIG. 5A-5B

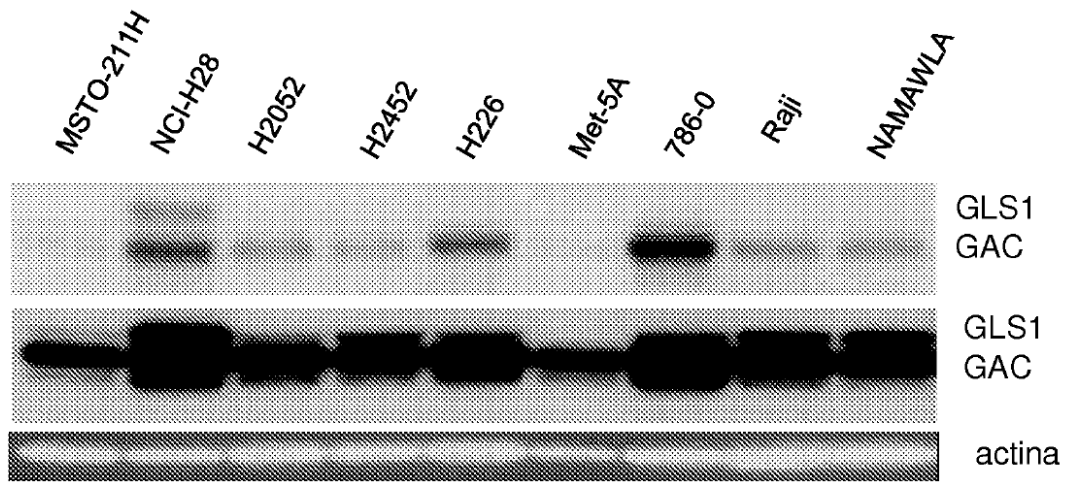


FIG. 5C

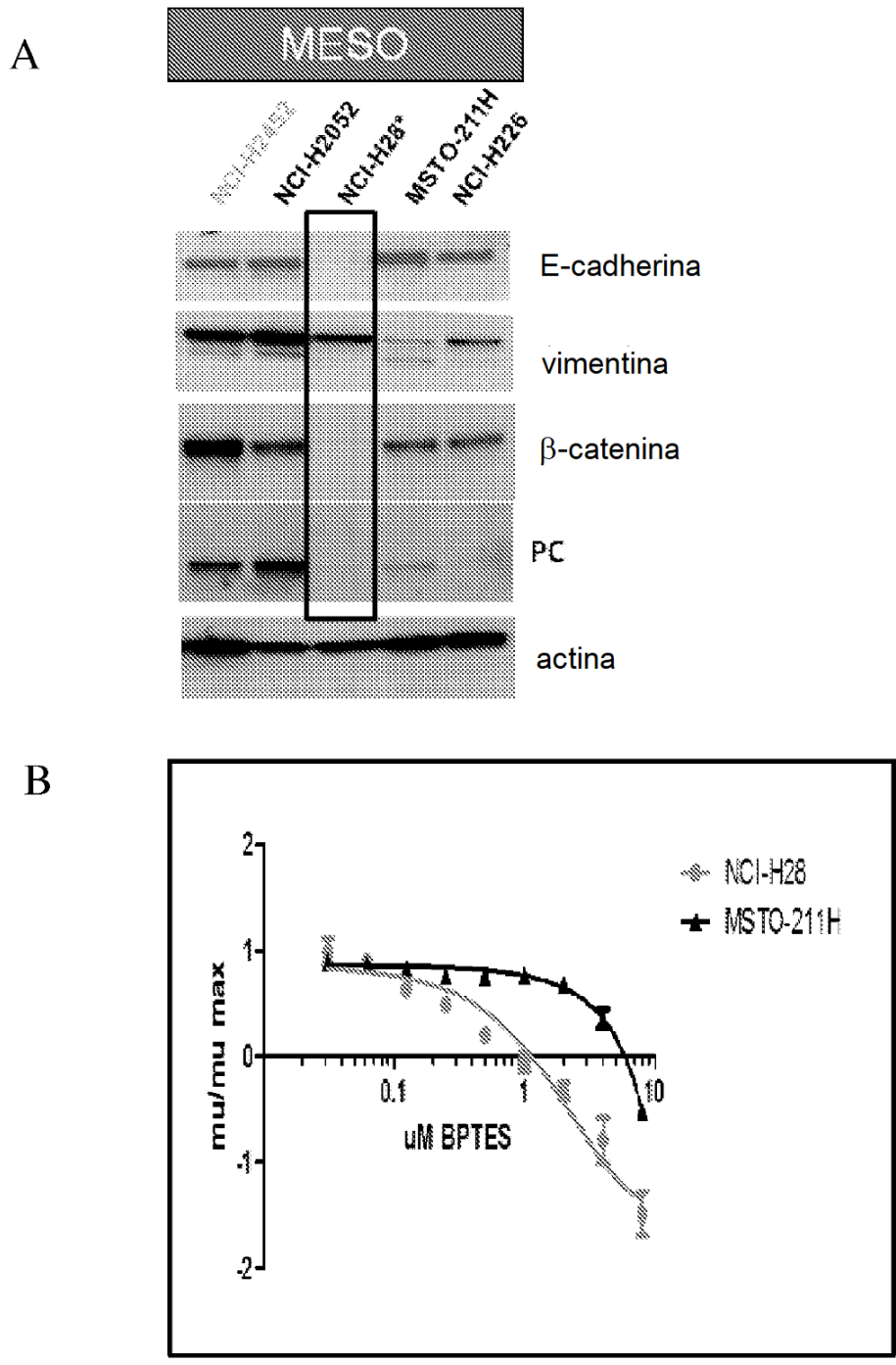
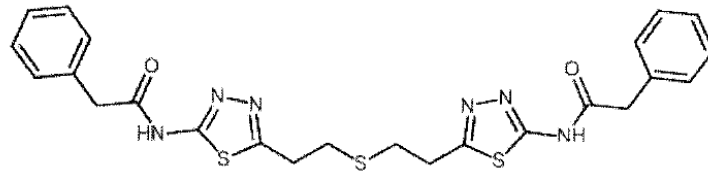
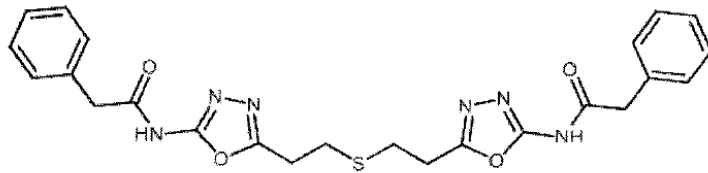


FIG. 6



BPTES



Compuesto I

FIG. 7

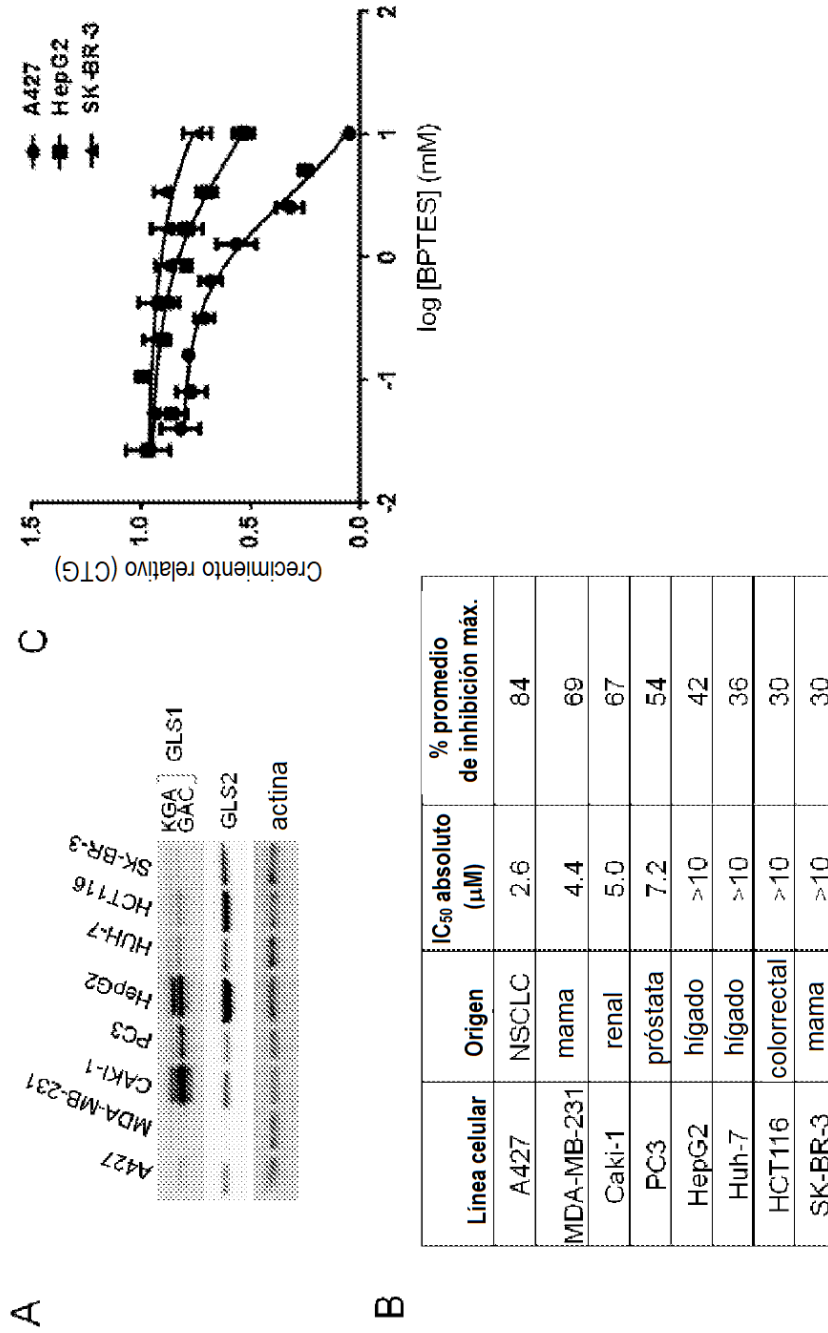


FIG. 8A-8C

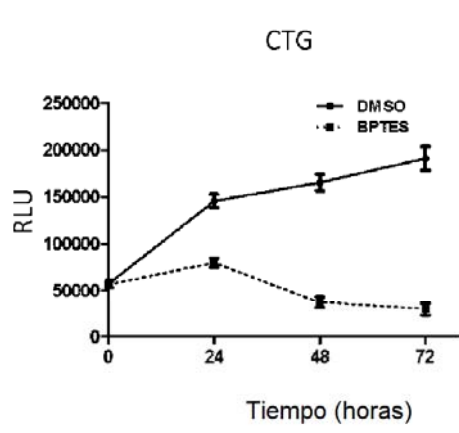


FIG. 9A

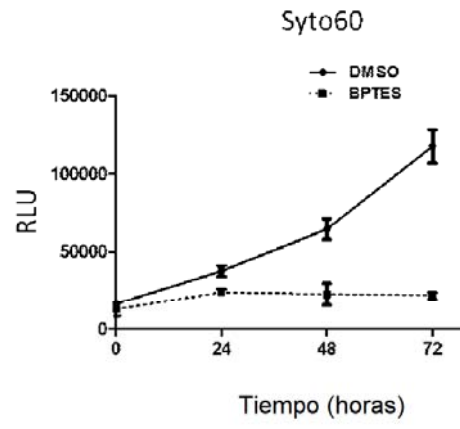


FIG. 9B

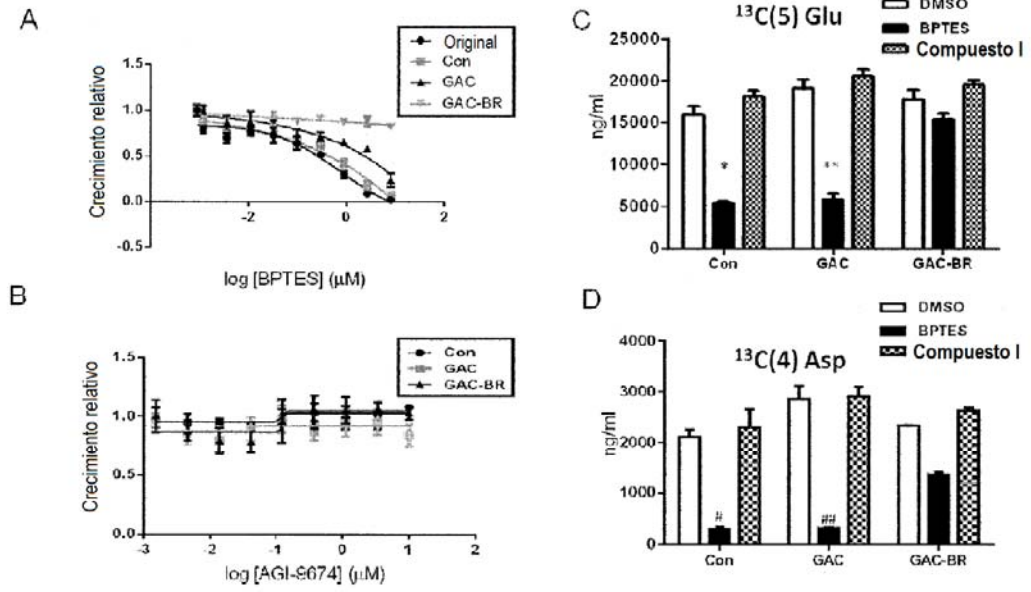


FIG. 10A-10D

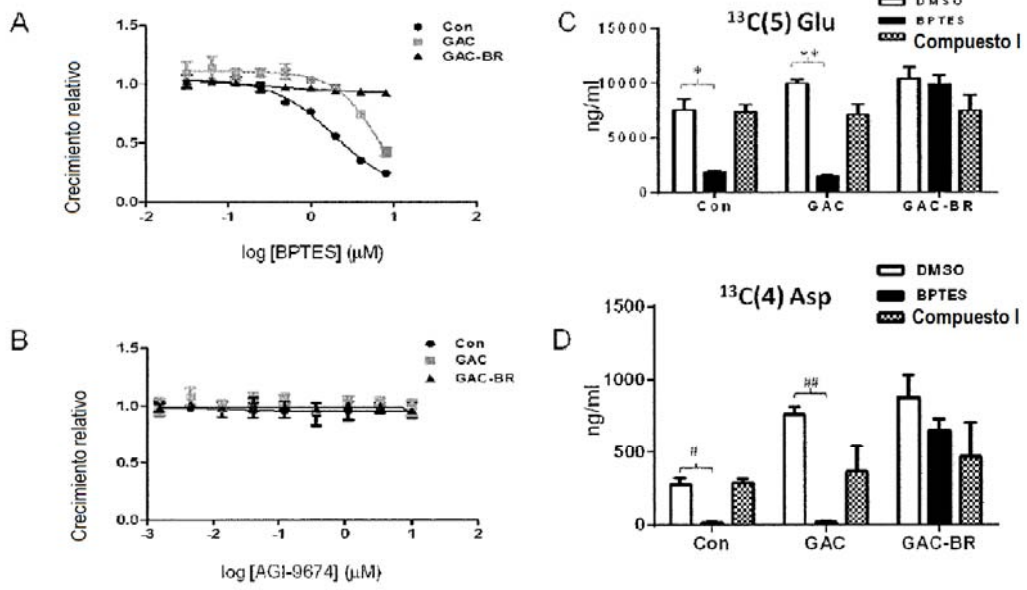


FIG. 11A-11D

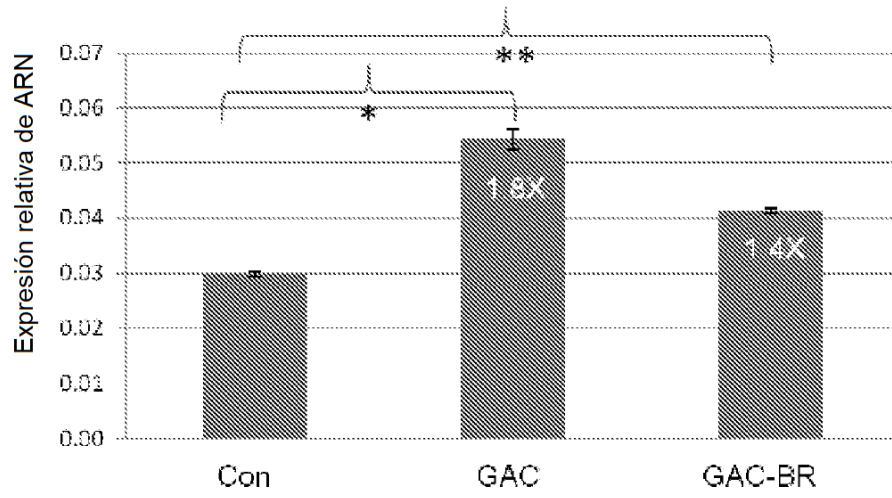


FIG. 12

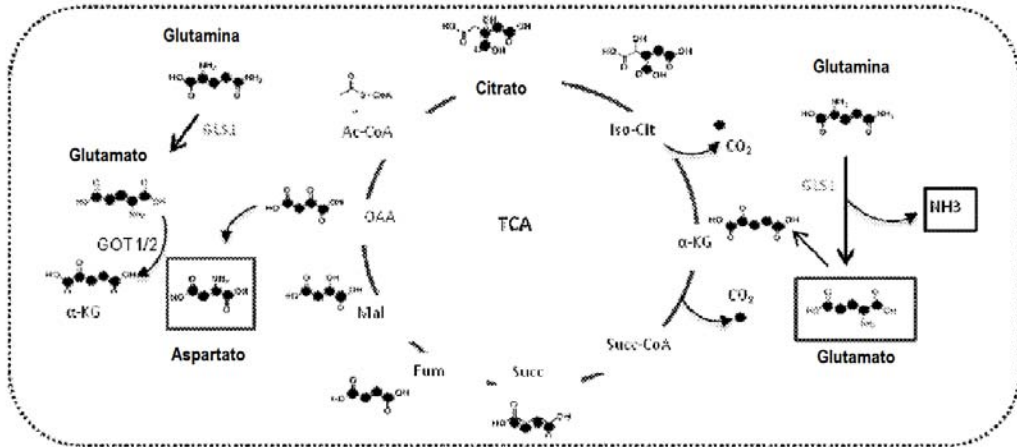


FIG. 13

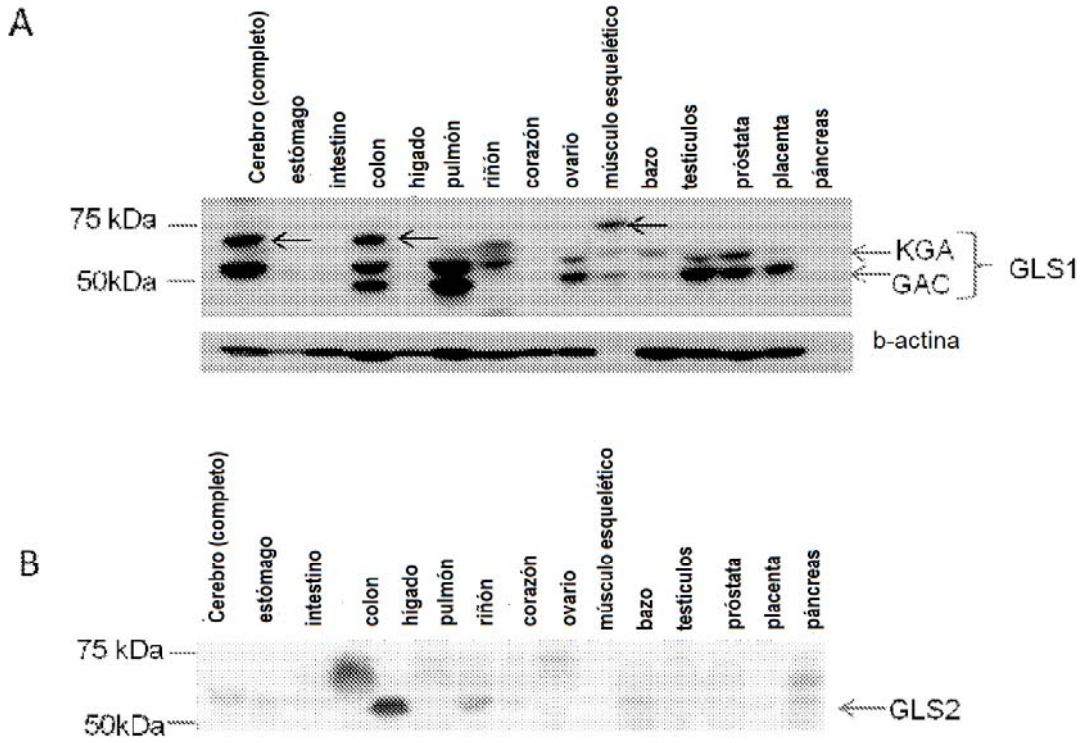


FIG. 14A-14B

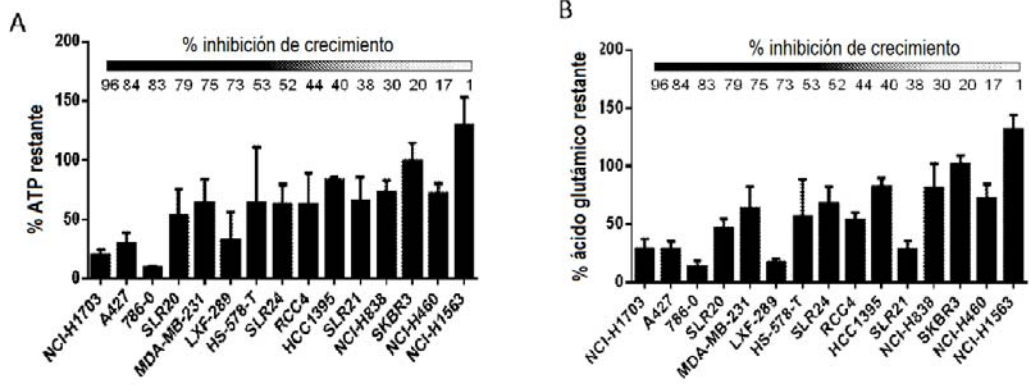


FIG. 15A-15B