



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105190313 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201480014311. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 10

G01N 33/574(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/776, 334 2013. 03. 11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/059585 2014. 03. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/141038 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·车 J·哈里斯 H·谢 李杰

刘峻 N·吴

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 沈端 杨昀

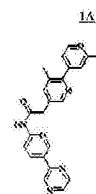
权利要求书6页 说明书29页 附图16页

(54) 发明名称

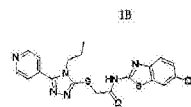
与 WNT 抑制剂相关的标记物

(57) 摘要

本发明提供监测生物标记物的差异性基因表达以确定患者对 Wnt 抑制剂敏感性的方法、通过测量生物标记物确定细胞对 Wnt 抑制剂敏感性的方法、对于候选 Wnt 抑制剂的筛选方法、用于头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂。



化合物A



化合物B

1. 一种预测癌症患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性的方法,该方法包括:
 - a) 提供癌症患者的癌症样本
 - b) 测量从该患者获得的癌症样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达;和
 - c) 将该至少一种生物标记物的差异性基因表达与对照组样本中该生物标记物的基因表达进行比较,
 - d) 将基因表达比较中的增加或减少与患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性相互关联。
2. 一种 Wnt 抑制剂治疗癌症患者的方法,该方法包括:
 - a) 提供来自癌症患者的癌症样本
 - b) 测量从该患者获得的该癌症样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达;
 - c) 将该至少一种生物标记物的该差异性基因表达与对照组样本中该生物标记物的基因表达进行比较;
 - d) 确定该患者对 Wnt 抑制剂的敏感性;和
 - e) 施用有效量的该 Wnt 抑制剂给已确定对该 Wnt 抑制剂敏感的患者。
3. 一种预测癌细胞对 Wnt 抑制剂的敏感性的方法,该方法包括:a) 测量该细胞中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达;b) 将该至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达与正常或对照组细胞的基因表达进行比较;c) 从该差异性基因表达的比较预测该癌细胞对 Wnt 抑制剂的敏感性。
4. 一种确定癌细胞对 Wnt 抑制剂的敏感性的方法,该方法包括:
 - a) 使癌细胞与至少一种 Wnt 抑制剂接触;
 - b) 测量与 Wnt 抑制剂接触的该细胞中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达;
 - c) 将该至少一种生物标记物的差异性基因表达与未经处理或经安慰剂处理的对照组细胞的生物标记物的基因表达进行比较;
 - d) 将该至少一种生物标记物的表达相较于未经处理或经安慰剂处理的对照组细胞的该至少一种生物标记物的表达的增加或减少与该癌细胞对 Wnt 抑制剂的敏感性相互关联。
5. 如权利要求 1 至 4 中任一项的方法,其中超过一种的生物标记物是选自表 1。
6. 如权利要求 1 至 5 中任一项的方法,其中该生物标记物为 Notch1。
7. 如权利要求 6 的方法,其中该 Notch1 在胞外域中具有突变。
8. 如权利要求 1 至 7 中任一项的方法,其中该至少一种生物标记物的差异性基因表达与对照组样本的基因表达的比较指示一种功能性 Wnt 路径。
9. 如权利要求 1 至 8 中任一项的方法,其中该癌症为头颈部鳞状细胞癌。
10. 如权利要求 2 或 4 的方法,其中该癌症是经 Wnt 抑制剂治疗和相较于对 Wnt 抑制剂敏感的癌症样本中的表达显示 Axin2、LEF1 和 / 或 NKD1 的差异性表达。
11. 如权利要求 1 至 10 中任一项的方法,其中与至少一种 Wnt 抑制剂接触的癌细胞的 IC_{50} 小于 $1 \mu M$, 优选小于 $0.5 \mu M$, 更优选小于 $0.2 \mu M$ 。
12. 根据权利要求 11 的方法,其中该细胞是在至少两个不同时间点与该 Wnt 抑制剂接触。

13. 根据权利要求 4、11 或 12 中任一项的方法,其中该细胞是在步骤 a) 下同时或依序与两种不同 Wnt 抑制剂接触。

14. 根据权利要求 4 或 11 至 13 中任一项的方法,其中在选自下组的时间点重复步骤 b) 和 c):施用各剂量的 Wnt 抑制剂后 4 小时、8 小时、16 小时、24 小时、48 小时、3 天、1 周、1 个月和数月。

15. 一种用于治疗患者中癌症的 Wnt 抑制剂,其中该患者是基于以下来选择:

a) 测量从该患者获得的癌症样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达;

b) 将该至少一种生物标记物的该差异性基因表达与对照组样本中的该生物标记物的基因表达进行比较;

c) 确定该患者对 Wnt 抑制剂的敏感性;和

d) 筛选对 Wnt 抑制剂敏感的患者。

16. 一种用于治疗相较于对照组基因表达具有至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达的患者的癌症的 Wnt 抑制剂,其中该差异性基因表达与对 Wnt 抑制剂敏感的患者相关联。

17. 根据权利要求 15 或 16 的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂,其中超过一种的生物标记物是选自表 1。

18. 根据权利要求 15 至 17 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物为 Notch1。

19. 根据权利要求 15 至 18 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂,其中该 Notch1 具有在胞外域中的突变。

20. 根据权利要求 15 至 19 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂,其中该癌症为头颈部鳞状细胞癌,优选地,该癌症样本经 Wnt 抑制剂处理后显示对 Wnt 抑制剂敏感的癌症样本的 Axin2、LEF1 和 / 或 NKD1 表达。

21. 一种用于治疗患者的癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该患者是基于显示相较于正常对照组细胞样本的从该患者获得的癌细胞样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的基因表达来选择,其中该差异性基因表达与对 Wnt 抑制剂敏感的患者相关联。

22. 一种用于治疗显示相较于对照组基因表达至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达的患者的癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该差异性基因表达与对 Wnt 抑制剂敏感的患者相关联。

23. 根据权利要求 21 或 22 的用于治疗癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中超过一种的生物标记物是选自表 1。

24. 根据权利要求 21 至 23 中任一项的用于治疗癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该生物标记物为 Notch1。

25. 根据权利要求 21 至 24 中任一项的用于治疗癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该 Notch1 具有在胞外域中的突变。

26. 根据权利要求 21 至 25 中任一项的用于治疗癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该癌症为头颈部鳞状细胞癌。

27. 一种用于预测癌症患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性的试剂盒,其包括:

- i) 用于检测选自表 1 的生物标记物的表达的装置 ; 和
 ii) 如何使用该试剂盒的使用说明。

28. 一种如权利要求 27 的试剂盒在项目 1 至 14 中任一种方法的用途。

29. 一种用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂。

30. 根据权利要求 29 的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂, 其中该 Wnt 抑制剂是施用于显示相较于对照组基因表达至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达的癌症患者, 其中该差异性基因表达与对 Wnt 抑制剂敏感的患者相关联。

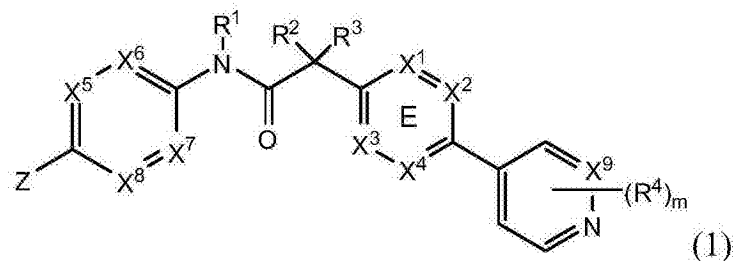
31. 根据权利要求 30 的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂, 其中该生物标记物为 Notch1。

32. 根据权利要求 1 至 14 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 中任一项的药物组合物或根据权利要求 29 的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂, 其中该 Wnt 抑制剂是以治疗有效量施用。

33. 根据权利要求 15 至 20 中任一项的用于治疗患者的癌症的 Wnt 抑制剂, 其中施用治疗有效量的该 Wnt 抑制剂给该患者。

34. 根据权利要求 33 的用于治疗患者的癌症的 Wnt 抑制剂, 其中将治疗有效量的该 Wnt 抑制剂选择性地施用给已确定对 Wnt 抑制剂敏感的患者, 或基于对该 Wnt 抑制剂不敏感的患者, 选择性地施用治疗有效量的除了 Wnt 抑制剂外的药物给该患者。

35. 根据权利要求 1 至 14 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 或 34 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 的试剂盒或根据权利要求 29 至 32 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂, 其中该 Wnt 抑制剂为式 (1) 的化合物 :



或其生理上可接受的盐, 其中 :

其中 X^1 、 X^2 、 X^3 和 X^4 是选自 N 和 CR⁷ ;

X^5 、 X^6 、 X^7 和 X^8 中的一个为 N, 其他为 CH ;

X^9 选自 N 和 CH ;

Z 选自苯基、吡嗪基、吡啶基、哒嗪基和哌嗪基 ; 其中 Z 的各苯基、吡嗪基、吡啶基、哒嗪基或哌嗪基任选被 R⁶ 基取代 ;

R¹、R² 和 R³ 为氢 ;

m 为 1 ;

R⁴ 选自氢、卤素、二氟甲基、三氟甲基和甲基 ;

R⁶ 选自氢、卤素和 -C(O)R¹⁰ ; 其中 R¹⁰ 为甲基 ; 和

R⁷ 选自氢、卤素、氰基、甲基和三氟甲基。

36. 根据权利要求 1 至 14 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 或 34 中任一项

的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该 Wnt 抑制剂为选自下组的化合物:N-[5-(3-氟苯基)吡啶-2-基]-2-[5-甲基-6-(吡嗪-4-基)吡啶-3-基]乙酰胺;

2-[5-甲基-6-(2-甲基吡啶-4-基)吡啶-3-基]-N-[5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基]乙酰胺;

N-(2,3'-联吡啶-6'-基)-2-(2',3-二甲基-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;

N-(5-(4-乙酰基吡嗪-1-基)吡啶-2-基)-2-(2'-甲基-3-(三氟甲基)-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;

N-(5-(4-乙酰基吡嗪-1-基)吡啶-2-基)-2-(2'-氟-3-甲基-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;和

2-(2'-氟-3-甲基-2,4'-联吡啶-5-基)-N-(5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基)乙酰胺;

或其药学上可接受的盐。

37. 根据权利要求 1 至 14 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 或 34 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该 Wnt 抑制剂为 2-[5-甲基-6-(2-甲基吡啶-4-基)吡啶-3-基]-N-[5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基]乙酰胺。

38. 根据权利要求 1 至 14 或 35 至 37 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 至 37 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 或 35 至 37 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 或 35 至 37 中任一项的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 或 35 至 37 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中表达或基因表达为 DNA 表达、DNA 拷贝数、mRNA 表达、cDNA 表达、蛋白质转录、蛋白质表达、DNA 修饰、cDNA 修饰、mRNA 修饰、蛋白质修饰、DNA 功能、cDNA 功能、mRNA 功能、蛋白质功能、DNA 突变、cDNA 突变、mRNA 突变、蛋白质突变、或其组合;优选是 DNA 突变。

39. 根据权利要求 1 至 14 或 35 至 38 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 至 38 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 或 35 至 38 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 或 35 至 37 中任一项的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 或 35 至 38 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物选自下组: Notch1、Notch2、Notch3、AXIN2、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 DTX3L。

40. 根据权利要求 1 至 14 或 35 至 38 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 至 38 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 或 35 至 38 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 或 35 至 37 中任一项的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 或 35 至 38 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物选自下组: Notch1、Notch2、Notch3、SFRP2、FRZB、SFRP4 和 DKK2。

41. 根据权利要求 1 至 14 或 35 至 38 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 至 38 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 或 35 至 38 中任一项的

物组合物、根据权利要求 27 或 35 至 37 中任一项的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 或 35 至 38 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物选自下组: Notch1、Notch2 和 Notch3。

42. 根据权利要求 1 至 14 或 35 至 38 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 至 38 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 或 35 至 38 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 或 35 至 37 中任一项的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 或 35 至 38 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物为 Notch1。

43. 根据权利要求 1 至 14 或 35 至 38 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 至 38 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 或 35 至 38 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 或 35 至 37 中任一项的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 或 35 至 38 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物选自下组: Notch1、Notch2、Notch3、AXIN2、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 DTX3L,优选 Notch1、Notch2、Notch3、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3 和 WNT7A。

44. 根据权利要求 1 至 14 或 35 至 38 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 至 38 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 或 35 至 38 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 或 35 至 37 中任一项的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 或 35 至 38 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物是 HRAS 或 FAT1。

45. 根据权利要求 1 至 14 或 35 至 38 中任一项的方法、根据权利要求 15 至 20、33 至 38 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据权利要求 21 至 26 或 35 至 38 中任一项的药物组合物、根据权利要求 27 或 35 至 37 中任一项的试剂盒、或根据权利要求 29 至 32 或 35 至 38 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物选自下组: Notch1、Notch2、Notch3、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 DTX3L,优选 Notch1、Notch2、Notch3、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3 和 DTX3L。

46. 一种选自表 1 的化合物作为生物标记物的用途。

47. 一种选自 Notch1、Notch2、Notch3、AXIN2、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 DTX3L 的化合物作为生物标记物的用途。

48. 一种选自 Notch1、Notch2、Notch3、SFRP2、FRZB、SFRP4 和 DKK2 的化合物作为生物标记物的用途。

49. 一种选自 Notch1、Notch2 和 Notch3 的化合物作为生物标记物的用途。

50. 化合物 Notch1 作为生物标记物的用途。

51. 一种选自 Notch1、Notch2、Notch3、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3 和 WNT7A 的化合物作为生物标记物的用途。

52. 化合物 HRAS 或 FAT1 作为生物标记物的用途。

53. 一种选自 Notch1、Notch2、Notch3、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 DTX3L，优选选自 Notch1、Notch2、Notch3、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3 和 DTX3L 的化合物作为生物标记物的用途。

54. 根据项目 46 至 53 中任一项的化合物的用途，其中该用途指示癌症患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性。

与 WNT 抑制剂相关的标记物

技术领域

[0001] 本发明涉及药物基因组学领域,和可用于确定治疗前的患者敏感性、治疗后的后续患者反应、癌症敏感性,筛选化合物、治疗方法和用于该治疗中的药物组合物的生物标记物的用途。

背景技术

[0002] Wnt 信号传导为多种癌症的一种重要致癌路径^{1,2}。在结合至其受体(在质膜处的低密度脂蛋白受体相关蛋白质 5/6(LRP5/6)和卷曲蛋白(FZD)(二者均为 Wnt 信号传导所需的单通道跨膜受体))后,Wnt 配体即可触发由 Axin2、GSK3 β 、APC 和其他蛋白质组成的 β -连环蛋白降解机制的中断,这导致 β -连环蛋白积聚于细胞质中³。 β -连环蛋白的浓度增加最终会导致其转位至细胞核中,以与 LEF/TCF 形成复合物,并驱动下游基因表达³。

[0003] Wnt 信号传导的失调¹可经由例如 APC 和 β -连环蛋白的下游组分的突变发生,其在结肠癌中有明确记录¹。此外,多种癌症中已报告 Wnt 配体或例如 RSP02/3 的共刺激剂的过度表达或 Wnt 抑制剂基因的沉默^{1,4}。另外,例如 Axin1/2 或 RSP0 共受体 RNF43/ZNFR3 的泛-Wnt 路径组分的突变在胰脏、结肠和肝细胞癌上扮演潜在性重要角色^{4,6}。动物模型中 Wnt 路径的不偏和靶向突变已证实此路径的致癌信号传导功能^{7,8}。除了典型 Wnt 路径之外,存在经由 FZD 和 VANGL 的非典型 Wnt 信号传导对于肿瘤发生的各方面(包括细胞迁移和肿瘤转移)具有重要性的将来的证据⁹。

[0004] 典型和非典型 Wnt 信号传导活性均取决于 Wnt 配体。在 Wnt 配体的生物合成期间,Wnt 会经历由豪猪(Porcupine)(PORCN)(一种膜结合的 O-酰基转移酶)所介导的翻译后酰化^{3,10}。PORCN 具特异性并专用于为随后的 Wnt 分泌所需的 Wnt 翻译后酰化¹¹。PORCN 的损失导致基因敲除小鼠模型中 Wnt 配体驱动的信号传导活性的抑制^{12,13}。在人类中,在异型接合子和就 PORCN 基因而言具有镶嵌性的那些中,PORCN 基因的功能损失(LoF)突变均引起与各种先天性异常相关联的 X 染色体性联显性遗传病的局灶性真皮发育不全。该表达型与胚胎发生和发育期间 Wnt 信号传导路径的作用一致^{14,15}。

[0005] 到目前为止在治疗上靶向 Wnt 信号传导的成功受限制。这很大程度上是因为缺乏对 Wnt 路径中标靶的有效治疗剂且缺乏将对 Wnt 抑制剂敏感的确定的患者群体。作为细胞周期中一连串复杂调节机制具差异性和差异性基因表达的结果,不同癌症类型可差异性地响应相同活性化合物。关于指示细胞对 PORCN 抑制剂或 Wnt 抑制剂的疗法的敏感性的特异性生物标记物的知识也很少。

发明内容

[0006] 本发明涉及 Notch1、Notch2、Notch3、AXIN2、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 / 或 DTX3L 在确定细胞对 Wnt 抑制剂敏感性中担当特异性生物标记物的分析。本发明涉及至少一种选自表 1 的生物标记物提供作为在预测哪些癌细胞或癌症对 Wnt 抑制剂具敏感

性中具有提高的准确度和特异度的 Wnt 抑制剂的“基因标签”的分析。该方法分析取自患者的癌症样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的表达、基因表达、突变状态、蛋白水平或功能和与对照组进行比较以预测癌症样本对 Wnt 抑制剂的敏感性。表达水平的图谱改变可指示有利反应或不利反应。此外，选自表 1 的基因标签具有增大的预测值，这是因为其也指示 Wnt 路径具功能性。本发明也提供“个人化医疗”的一个实例，其中患者是基于对该个体具有特异性的功能性基因组特征进行治疗。

[0007] 也可在 Wnt 抑制剂治疗之后使用公开于本文中的至少一种生物标记物的预测值来确定患者是否仍对该治疗敏感。一旦已施用 Wnt 抑制剂，即可利用生物标记物以监测该患者对 Wnt 抑制剂治疗的持续敏感性。本发明也关于在用 Wnt 抑制剂治疗之前和之后所识别出的基因的表达的上调或下调。这在确定患者接受正确疗程中是有用的。本发明包括一种预测和监测患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性的方法。该方法包括施用 Wnt 抑制剂给该患者和测量取自该患者的生物样本上的生物标记物基因表达的步骤。基于检测至少一种选自表 1 的生物标记物的基因表达来评估该患者的反应。相较于对照组至少一种生物标记物的表达水平的检测和 / 或改变指示患者对治疗的敏感性。表达水平图谱的改变可指示有利的患者反应或不利的患者反应。

[0008] 本发明也提供用于治疗头颈部癌的 Wnt 抑制剂。预测特别好的治疗反应是在相较于对照组在其癌症样本中差异性地下调至少一种选自表 1 的生物标记物的表达的患者中。

[0009] 本发明的方面、特征和实施方式概述于以下项目中，且可分别单独地或以组合方式使用：

[0010] 1. 一种预测癌症患者对 Wnt 抑制剂的治疗的敏感性的方法，该方法包括：

[0011] a) 提供来自癌症患者的癌症样本

[0012] b) 测量从该患者获得的该癌症样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达；和

[0013] c) 将至少一种生物标记物的该差异性基因表达与对照组样本中该生物标记物的基因表达进行比较，

[0014] d) 将基因表达比较中的增加或减少与该患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性产生关联。

[0015] 2. 一种 Wnt 抑制剂治疗癌症患者的方法，该方法包括：

[0016] a) 提供来自癌症患者的癌症样本

[0017] b) 测量从该患者获得的该癌症样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达；

[0018] c) 将该至少一种生物标记物的该差异性基因表达与对照组样本中该生物标记物的基因表达进行比较；

[0019] d) 确定该患者对 Wnt 抑制剂的敏感性；和

[0020] e) 施用有效量的该 Wnt 抑制剂给已确定对该 Wnt 抑制剂敏感的患者。

[0021] 3. 一种预测癌细胞对 Wnt 抑制剂的敏感性的方法，该方法包括：a) 测量该细胞中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达；b) 将至少一种选自表 1 的生物标记物的该差异性基因表达与正常或对照组细胞的基因表达进行比较；

[0022] c) 自该差异性基因表达的比较预测该癌细胞对 Wnt 抑制剂的敏感性。

- [0023] 4. 一种确定癌细胞对 Wnt 抑制剂的敏感性的方法,该方法包括:
- [0024] a) 使癌细胞与至少一种 Wnt 抑制剂接触;
- [0025] b) 测量已与该 Wnt 抑制剂接触的该细胞中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达;
- [0026] c) 将该至少一种生物标记物的该差异性基因表达与来自未经处理或经安慰剂处理的对照组细胞的该生物标记物的基因表达进行比较;
- [0027] d) 将该至少一种生物标记物的表达相较于来自未经处理或经安慰剂处理的对照组细胞的该至少一种生物标记物的表达的增加或减少与该癌细胞对 Wnt 抑制剂的敏感性产生关联。
- [0028] 5. 根据项目 1 至 4 中任一项的方法,其中超过一种的生物标记物是选自表 1。
- [0029] 6. 根据项目 1 至 5 中任一项的方法,其中该生物标记物为 Notch1。
- [0030] 7. 根据项目 6 的方法,其中该 Notch1 具有在胞外域中的突变。
- [0031] 8. 根据项目 1 至 7 中任一项的方法,其中该至少一种生物标记物的差异性基因表达与对照组样本的基因表达的比较指示功能性 Wnt 路径。
- [0032] 9. 根据项目 1 至 8 中任一项的方法,其中该癌症为头颈部鳞状细胞癌。
- [0033] 10. 根据项目 2 或 4 的方法,其中该癌症是由 Wnt 抑制剂治疗和显示相较于对 Wnt 抑制剂敏感的癌症样本中的表达的 Axin2、LEF1 和 / 或 NKD1 的差异性表达。
- [0034] 11. 根据项目 1 至 10 中任一项的方法,其中已与至少一种 Wnt 抑制剂接触的癌细胞的 IC_{50} 小于 $1 \mu M$, 优选小于 $0.5 \mu M$, 更优选小于 $0.2 \mu M$ 。
- [0035] 12. 根据项目 11 的方法,其中该细胞是在至少两个不同时间点与该 Wnt 抑制剂接触。
- [0036] 13. 根据项目 4、11 或 12 中任一项的方法,其中该细胞是在步骤 a) 下同时或依序与两种不同 Wnt 抑制剂接触。
- [0037] 14. 根据项目 4、或 11 至 13 中任一项的方法,其中在选自下组的时间点重复步骤 b) 和 c): 施用各剂量的 Wnt 抑制剂后 4 小时、8 小时、16 小时、24 小时、48 小时、3 天、1 周、1 个月和数个月。
- [0038] 15. 一种用于治疗患者中癌症的 Wnt 抑制剂,其中该患者是基于以下来选择:
- [0039] a) 测量从该患者获得的癌症样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达;
- [0040] b) 将该至少一种生物标记物的该差异性基因表达与对照组样本中的该生物标记物的基因表达进行比较;
- [0041] c) 确定该患者对 Wnt 抑制剂的敏感性;和
- [0042] d) 筛选对 Wnt 抑制剂敏感的患者。
- [0043] 16. 一种用于治疗相较于对照组基因表达具有至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达的患者的癌症的 Wnt 抑制剂,其中该差异性基因表达是与对 Wnt 抑制剂敏感的患者相关联。
- [0044] 17. 根据项目 15 或 16 的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂,其中超过一种的生物标记物是选自表 1。
- [0045] 18. 根据项目 15 至 17 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物

为 Notch1。

[0046] 19. 根据项目 15 至 18 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂,其中该 Notch1 具有在胞外域中的突变。

[0047] 20. 根据项目 15 至 19 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂,其中该癌症为头颈部鳞状细胞癌,优选地,该癌症样本经 Wnt 抑制剂处理后显示对 Wnt 抑制剂敏感的癌症样本的 Axin2、LEF1 和 / 或 NKD1 表达。

[0048] 21. 一种用于治疗患者的癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该患者是基于显示相较于正常对照组细胞样本的从该患者获得的癌细胞样本中至少一种选自表 1 的生物标记物的基因表达来选择,其中该差异性基因表达是与对 Wnt 抑制剂敏感的患者相关联。

[0049] 22. 一种用于治疗显示相较于对照组基因表达至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达的患者的癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该差异性基因表达是与对 Wnt 抑制剂敏感的患者相关联。

[0050] 23. 根据项目 21 或 22 的用于治疗癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中超过一种的生物标记物是选自表 1。

[0051] 24. 根据项目 21 至 23 中任一项的用于治疗癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该生物标记物为 Notch1。

[0052] 25. 根据项目 21 至 24 中任一项的用于治疗癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该 Notch1 具有在胞外域中的突变。

[0053] 26. 根据项目 21 至 25 中任一项的用于治疗癌症的包含 Wnt 抑制剂的药物组合物,其中该癌症为头颈部鳞状细胞癌。

[0054] 27. 一种用于预测癌症患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性的试剂盒,其包括:

[0055] i) 用于检测选自表 1 的生物标记物的表达的装置;和

[0056] ii) 如何使用该试剂盒的使用说明。

[0057] 28. 一种如项目 27 的试剂盒在项目 1 至 14 中任一种方法的用途。

[0058] 29. 一种用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂。

[0059] 30. 根据项目 29 的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该 Wnt 抑制剂是施用于显示相较于对照组基因表达至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性基因表达的癌症患者,其中该差异性基因表达与对 Wnt 抑制剂敏感的患者相关联。

[0060] 31. 根据项目 30 的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该生物标记物为 Notch1。

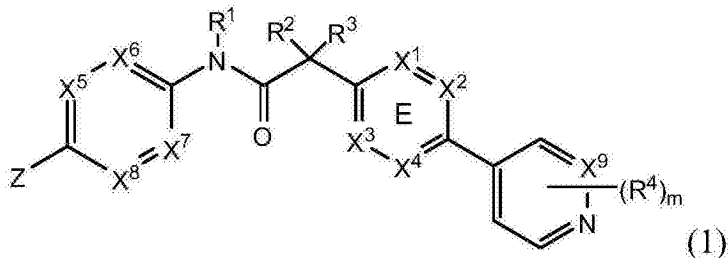
[0061] 32. 根据项目 1 至 14 中任一项的方法、根据项目 15 至 20 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据项目 21 至 26 中任一项的药物组合物、或根据项目 29 的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该 Wnt 抑制剂是以治疗有效量施用。

[0062] 33. 根据项目 15 至 20 中任一项的用于治疗患者的癌症的 Wnt 抑制剂,其中施用治疗有效量的该 Wnt 抑制剂给该患者。

[0063] 34. 根据项目 33 的用于治疗患者的癌症的 Wnt 抑制剂,其中将治疗有效量的该 Wnt 抑制剂选择性地施用给已确定对 Wnt 抑制剂敏感的患者,或基于对该 Wnt 抑制剂不敏感的患者,选择性地施用治疗有效量的除了 Wnt 抑制剂外的药物给该患者。

[0064] 35. 根据项目 1 至 14 中任一项的方法、根据项目 15 至 20、33 或 34 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据项目 21 至 26 中任一项的药物组合物、根据项目 27 的试剂盒或根据项目 29 至 32 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该 Wnt 抑制剂为式 (1) 的化合物:

[0065]



[0066] 或其生理上可接受的盐,其中:

[0067] 其中 X^1 、 X^2 、 X^3 和 X^4 是选自 N 和 CR⁷;

[0068] X^5 、 X^6 、 X^7 和 X^8 中的一个为 N,其他为 CH;

[0069] X^9 选自 N 和 CH;

[0070] Z 选自苯基、吡嗪基、吡啶基、哒嗪基和哌嗪基;其中 Z 的各苯基、吡嗪基、吡啶基、哒嗪基或哌嗪基是任选被 R⁶ 基取代;

[0071] R¹、R² 和 R³ 为氢;

[0072] m 为 1;

[0073] R⁴ 选自氢、卤素、二氟甲基、三氟甲基和甲基;

[0074] R⁶ 选自氢、卤素和 -C(O)R¹⁰;其中 R¹⁰ 为甲基;和

[0075] R⁷ 选自氢、卤素、氰基、甲基和三氟甲基。

[0076] 36. 根据项目 1 至 14 中任一项的方法、根据项目 15 至 20、33 或 34 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据项目 21 至 26 中任一项的药物组合物、根据项目 27 的试剂盒、或根据项目 29 至 32 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该 Wnt 抑制剂为选自下组的化合物:N-[5-(3-氟苯基)吡啶-2-基]-2-[5-甲基-6-(哒嗪-4-基)吡啶-3-基]乙酰胺;

[0077] 2-[5-甲基-6-(2-甲基吡啶-4-基)吡啶-3-基]-N-[5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基]乙酰胺;

[0078] N-(2,3'-联吡啶-6'-基)-2-(2',3-二甲基-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;

[0079] N-(5-(4-乙酰基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-2-(2'-甲基-3-(三氟甲基)-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;

[0080] N-(5-(4-乙酰基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-2-(2'-氟-3-甲基-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;和

[0081] 2-(2'-氟-3-甲基-2,4'-联吡啶-5-基)-N-(5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基)乙酰胺;

[0082] 或其药学上可接受的盐。

[0083] 37. 根据项目 1 至 14 中任一项的方法、根据项目 15 至 20、33 或 34 中任一项的用于治疗癌症的 Wnt 抑制剂、根据项目 21 至 26 中任一项的药物组合物、根据项目 27 的试

剂盒、或根据项目 29 至 32 中任一项的用于治疗头颈部鳞状细胞癌的 Wnt 抑制剂,其中该 Wnt 抑制剂为 2-[5-甲基-6-(2-甲基吡啶-4-基)吡啶-3-基]-N-[5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基]乙酰胺。

[0084] 38. 根据项目 1 至 37 中的任一项,其中表达或基因表达为 DNA 表达、DNA 拷贝数、mRNA 表达、cDNA 表达、蛋白质转录、蛋白质表达、DNA 修饰、cDNA 修饰、mRNA 修饰、蛋白质修饰、DNA 功能、cDNA 功能、mRNA 功能、蛋白质功能、DNA 突变、cDNA 突变、mRNA 突变、蛋白质突变、或其组合;优选是 DNA 突变。

[0085] 39. 根据项目 1 至 38 中的任一项,其中该生物标记物选自下组:Notch1、Notch2、Notch3、AXIN2、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 DTX3L。

[0086] 40. 根据项目 1 至 38 中的任一项,其中该生物标记物选自下组:Notch1、Notch2、Notch3、AXIN2、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 DTX3L。

[0087] 41. 根据项目 1 至 38 中的任一项,其中该生物标记物选自下组:Notch1、Notch2、Notch3、SFRP2、FRZB、SFRP4 和 DKK2。

[0088] 42. 根据项目 1 至 38 中的任一项,其中该生物标记物选自下组:Notch1、Notch2 和 Notch3。

[0089] 43. 根据项目 1 至 38 中的任一项,其中该生物标记物为 Notch1。

[0090] 44. 根据项目 1 至 38 中的任一项,其中该生物标记物选自下组:Notch1、Notch2、Notch3、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3 和 WNT7A。

[0091] 45. 根据项目 1 至 38 中的任一项,其中该生物标记物为 HRAS 或 FAT1。

[0092] 46. 根据项目 1 至 38 中的任一项,其中该生物标记物选自下组:FAM58A、FLJ43860、NOTCH1、OR7G3、CCDC168、ZNF527 和 CDKN2A。

[0093] 47. 根据项目 1 至 38 中任一项的实施方式,其中该生物标记物选自下组:Notch1、Notch2、Notch3、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A、和 DTX3L 的组,优选是选自 Notch1、Notch2、Notch3、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、和 DTX3L。

[0094] 48. 一种以选自表 1 的化合物作为生物标记物的用途。

[0095] 49. 一种以选自 Notch1、Notch2、Notch3、AXIN2、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A、和 DTX3L 的组的化合物作为生物标记物的用途。

[0096] 50. 一种以选自 Notch1、Notch2、Notch3、SFRP2、FRZB、SFRP4 和 DKK2 的组的化合物作为生物标记物的用途。

[0097] 51. 一种以选自 Notch1、Notch2 和 Notch3 的组的化合物作为生物标记物的用途。

[0098] 52. 一种以化合物 Notch1 作为生物标记物的用途。

[0099] 53. 一种以选自 Notch1、Notch2、Notch3、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3 和 WNT7A 的组的化合物作为生物标记物的用途。

[0100] 54. 一种以选自 Notch1、Notch2、Notch3、AXIN2、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4、DKK2、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A 和 DTX3L 的组的化合物作为生物标记物的用途。

[0101] 55. 一种以化合物 HRAS 或 FAT1 作为生物标记物的用途。

[0102] 56. 一种以选自由 FAM58A、FLJ43860、NOTCH1、OR7G3、CCDC168、ZNF527 和 CDKN2A 组成的组的化合物作为生物标记物的用途。

[0103] 57. 一种以选自 Notch1、Notch2、Notch3、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A、和 DTX3L 的组, 优选选自 Notch1、Notch2、Notch3、FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、HRAS、FAT1、OR7G3、和 DTX3L 的组的化合物作为生物标记物的用途。

[0104] 58. 根据项目 48 至 57 中任一项的化合物的用途, 其中该用途指示癌症患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性。

[0105] 59. 根据项目 39 至 42、44 至 51、或 53 至 58 中的任一项, 其中至少两种生物标记物、至少三种或至少四种生物标记物是用于共同指示癌症患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性。

[0106] 60. 根据项目 1 至 59 中的任一项, 其中:

[0107] - 患者样本中的 WNT11、WNT10A、WNT3 或 WNT7A 表达较对照组更高, 该表达指示患者对 Wnt 抑制剂的治疗的敏感性;

[0108] - 患者样本中的 AXIN2、LEF1 或 NKD1 表达相较于处理前对照组在处理之后减少, 该表达指示患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性;

[0109] - 患者样本中的 Notch1、Notch2 或 Notch3 表达相较于对照组减少 (具体地, 活性或功能的降低), 该表达 (具体地, 活性或功能的降低) 指示患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性;

[0110] - 患者样本中的 SFRP2、FRZB、SFRP4 或 DKK2 表达较对照组更低, 该表达指示患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性;

[0111] - 患者样本中的 FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、FAT1、OR7G3 或 DTX3L 表达相较于对照组更低 (具体地, 功能的损失更高), 该表达 (具体地, 功能的损失) 指示患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性;

[0112] - 患者样本中的 HRAS 表达相较于对照组更高 (具体地, 功能增强), 指示患者对 Wnt 抑制剂治疗的敏感性。

[0113] 61. 根据项目 60, 其中该 Wnt 抑制剂是如项目 35 至 37 中任一项所定义。

附图说明

[0114] 图 1A 显示化合物 A 的结构。图 1B 显示化合物 B 的结构。

[0115] 图 2A 显示 ³H-放射性标记的化合物 B 与 PORCN 的结合。化合物 B 与 PORCN 之间的特异性相互作用可通过未标记的化合物 B 竞争消除 (图 2A)。图 2B 显示化合物 A 与 PORCN 的结合。

[0116] 图 3A 显示在 Wnt 共同培养检测中化合物 A 对 Wnt 信号传导的有效抑制作用, IC₅₀ 为 0.4nM。图 3B 绘示抑制效果是通过添加经外源 Wnt3A 调节的条件培养液恢复。

[0117] 图 4 显示不同剂量的化合物 A 对经 HA-Wnt3A 转染的 293A 细胞的效应。如图 4 所显示, 化合物 A 有效地减低 HA-Wnt3A 在上清液中的丰度同时保留溶胞产物 HA-Wnt3A, 表明 Wnt3A 分泌是以剂量依赖性方式实质上受化合物 A 抑制。

[0118] 图 5A 展现化合物 A 实际上强烈阻断自分泌 L-Wnt3A 细胞 (一种过度表达 Wnt3A 的小鼠乳腺细胞系) 中 LRP6 的 Wnt 依赖性磷酸化。图 5B 显示在所有 19 种 Wnt 当中保留推定的 Wnt 棕榈酰基化位点 (Ser209) 周围的残基。图 5C 显示化合物 A 证实抗所有所测试的 Wnt (包括 Wnt1、2、3、3A、6、7A、和 9A) 的相当的抑制活性。

[0119] 图 6 为每种癌症类型的不同细胞系对化合物 A 的治疗的响应。响应性细胞系定义为在以 10 至 100nM 化合物 A 处理 48 小时后达成大于 50% 的 AXIN2 mRNA 减少。如图 6 所显示, 头颈部癌细胞 (HNSCC) 系属于响应化合物 A 的前几种癌症类型。

[0120] 图 7 显示在 HNSCC 细胞系当中, 96 个中有 31 个在化合物 A 处理后显示 Wnt 路径抑制。

[0121] 图 8A 显示化合物 A 有效地抑制 HN30 中的 Wnt 依赖性 AXIN2 产生, IC_{50} 为 0.3nM。图 8B 绘示化合物 A 强烈地减低 HN30 菌落形成, 但 IC_{50} 右移。

[0122] 图 9A 显示化合物 A 的减少菌落形成的效应可部分地通过过度表达显性 β -连环蛋白恢复。图 9B 证实化合物 A 的细胞效应与 PORCN 依赖性 Wnt 信号传导活性的抑制一致; 对 PORCN 的 shRNA 实质上抑制 Wnt 靶基因 AXIN2 的表达。图 9C 显示对 PORCN 的 shRNA 也抑制体外 HN30 细胞的菌落形成。

[0123] 图 10 显示化合物 A 的体内抗肿瘤活性; 也就是, 在 HNSCC HN30 的小鼠皮下异种移植模型中。当每天一次给药时, 化合物 A 诱导剂量依赖性药效和减少肿瘤重量 (图 10A)。在化合物 A 以 3mg/kg 的单次给药之后, 肿瘤中 AXIN2 mRNA 表达的程度在给药后 5 至 10 小时之间减低 ~ 60 至 95% (图 10B)。另外, 如图 10C 所显示, HN30 肿瘤中的 pLRP6 水平实质上以时间依赖性方式减低。

[0124] 图 11 为 HNSCC 细胞系组中最会突变的致癌基因或肿瘤抑制基因。

[0125] 图 12 为其聚集功能损失突变与来自 HNSCC 细胞系的化合物 A PD 响应数据最优选相关联的前几种候选基因。

[0126] 图 13A 和图 13B 显示化合物 A 响应性头颈部癌细胞系中的高度富集的 Notch1 功能损失 (LoF) 突变。A) 头颈部癌细胞系中 Notch1 的潜在 LoF 突变的图。N: N-端; C: C-端; LNR: Lin12-Notch 重复; TMD: 跨膜域; PEST: 脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸富集 (PEST) 域。框移 (fs) 和无义突变 (X) 包括 E488fs、A495fs、K538fs、G192X、P460fs、E216X, 以红色突显。B) 头颈部癌细胞系中 Notch1 框移和无义突变的列表。C) Notch1C478F 显示在 DLL1 刺激或无 DLL1 刺激下的 Notch1 报告基因检测中相较于野生型其活性完全减低。

[0127] 图 14 显示化合物 A 的体内药效。于小鼠 SNU1076 异种移植模型中, 于 5mg/kg 剂量下的化合物 A 在 14 天处理之后明显抑制肿瘤生长 (T/C: 25%) (图 14A)。化合物 A 实质上抑制 Wnt 路径, 这点如 AXIN2 减少 70% 所指示 (图 14B)。

[0128] 图 15 显示头颈癌细胞系中的 FAT1 突变。FAT1 突变集中在化合物 A 响应性头颈癌细胞系中。

[0129] 图 16 显示头颈癌细胞系中的 HRAS 突变。HRAS 突变集中在化合物 A 响应性头颈癌细胞系中。

具体实施方式

[0130] 定义

[0131] 除非本文清楚地另作指明,否则如本说明书和权利要求书所用,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数形式的参考。例如,术语“一个细胞”包括复数个细胞,包括其混合物。

[0132] 例如 pH、温度、时间、浓度、和分子量的所有指定数值(包括范围)为可改变(+或-)0.1 增量的近似值,虽然不总是明确规定,然而,应了解所有指定数值前面存在术语“约”。虽然不总是明确规定,然而,也应了解描述于本文中的试剂仅是示例性的,且那些等效物是为本领域所熟知的。

[0133] 本文中术语“标记物”或“生物标记物”可互换使用。生物标记物为核酸或多肽和该核酸或多肽的存在、不存在或差异性表达、描述基因数量的参数、基因或蛋白质突变、功能或活性,且用于确定对任何 Wnt 抑制剂的敏感性。例如,Notch1 为生物标记物,且癌症样本细胞中 Notch1 的 mRNA 表达相较于正常(非癌性)组织或对照组织中的 Notch1 表达减少。

[0134] “PORCN”是指豪猪,一种 Wnt 翻译后修饰时所需的膜结合酰基转移酶。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的 PORCN 是指人类 PORCN,检索号 NM_017617.3/NP_060087(4851/P46531.4)。

[0135] “Notch1”是指 Notch 同系物 1。其为 Notch 信号传导中的单通道跨膜受体。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的 Notch1 是指人类 Notch1,检索号 NM_017617.3/NP_060087/GI:148833508(4851/P46531.4)。“Notch2”是指神经性基因座 notch 同系物蛋白质 2,一种 Notch 信号传导中的单通道跨膜受体。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的 Notch2 是指人类 Notch2,检索号 NM_024408.3/NP_077719/GI:24041035(4853/Q04721.3)。“Notch3”是指神经性基因座 notch 同系物蛋白质 3,一种 Notch 信号传导中的单通道跨膜受体。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的 Notch3 是指人类 Notch3,检索号 NM_000435.2/NP_000426/GI:134244285(4854/Q9UM47.2)。

[0136] “AXIN2”是指轴抑制蛋白质 2。其为在调节 β -连环蛋白的稳定性中具有重要作用的细胞溶质蛋白质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的 AXIN2 是指人类 AXIN2,检索号 NM_004655.3/NP_004646/GI:195927059(8313/Q9Y2T1)。

[0137] “LEF1”是指淋巴增强子-结合因子 1。其为与 β -连环蛋白形成复合物和驱动下游靶基因表达的核蛋白。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的 LEF1 是指人类 LEF1,检索号 NM_016269/NP_001124185/GI:7705917(51176/Q9UJU2.1)。

[0138] “NKD1”是指裸角质层 1。其为与蓬乱蛋白(Disheveled)相互作用的细胞溶质蛋白质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的 NKD1 是指人类 NKD1,检索号 NM_033119/NP_149110/GI:14916433(85407/Q969G9.1)。

[0139] “SFRP2”是指分泌卷曲相关蛋白 2。其为 Wnt 信号传导的可溶性调节物质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的 SFRP2 是指人类 SFRP2,检索号 NM_003013.2/NP_003004/GI:48475052(6423/Q96HF1.2)。

[0140] “FRZB”是指卷曲相关蛋白,也是一种 Wnt 信号传导的可溶性调节物质。除非另

外明确地陈述,否则如本文所用的FRZB是指人类FRZB,检索号NM_001463.3/NP_001454/GI:38455388(2487/Q92765.2)。

[0141] “SFRP4”是指分泌卷曲相关蛋白4,也是一种Wnt信号传导的可溶性调节物质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的SFRP4是指人类SFRP4-检索号NM_003014.3/NP_003005/GI:170784838(6424/Q6FHJ7.2)。

[0142] “DKK2”是指dickkopf-相关蛋白2,也是一种Wnt信号传导的可溶性调节物质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的DKK2是指人类DKK2,检索号NM_014421.2/NP_055236/GI:7657023(27123/Q9UBU2.1)。

[0143] “WNT11”是指WNT 11。其为分泌Wnt配体蛋白质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的WNT11是指人类WNT11,检索号NM_004626.2/NP_004617/GI:17017974(7481/096014)。

[0144] “WNT10A”是指WNT10A,也是一种分泌Wnt配体蛋白质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的WNT10A是指人类WNT10A,检索号NM_025216.2/NP_079492/GI:16936520(80326/Q9GZT5)。

[0145] “WNT3”是指WNT3,也是一种分泌Wnt配体蛋白质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的WNT3是指人类WNT3,检索号NM_030753.3/NP_110380/GI:13540477(7473/P56703)。

[0146] “WNT7A”是指WNT7A,也是一种分泌Wnt配体蛋白质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的WNT7A是指人类WNT7A,检索号NM_004625.3/NP_004616/GI:17505191(7476/000755)。

[0147] “FAM58A”是指具有序列相似性家族58的成员A。该基因包含细胞周期蛋白箱式折叠域(cyclin-box-fold domain),可具有控制核细胞分裂周期的作用。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的FAM58A是指人类FAM58A,检索号NM_152274.3/NP_689487/GI:196049382(92002/Q8N1B3)。

[0148] “FLJ43860”是指FLJ43860蛋白,一种功能未知的未特征化蛋白质。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的FLJ43860是指人类FLJ43860,检索号NM_207414.2/NP_997297/GI:148727311(389690/Q6ZUA9)。

[0149] “CDKN2A”是指细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A,一种用于细胞周期进展的重要抑制剂。除非另外明确地陈述,否则如本文所用的CDKN2A是指人类CDKN2A,检索号NM_000077.4/NP_478104/GI:4502749(1029/P42771)。

[0150] “OR7G3”是指嗅觉受体7G3,为嗅觉G-蛋白偶联受体(GPCR)受体之一。除非另外明确地陈述,否则本文所用的OR7G3是指人类OR7G3,检索号NM_001001958.1/NP_001001958/GI:50080201(390883/Q8NG95)。

[0151] “DTX3L”是指类似Deltex 3,一种E3泛素连接酶,其果蝇同系物Deltex为果蝇中Notch信号传导的正调节物质。除非另外明确地陈述,否则本文所用的DTX3L是指人类DTX3L,检索号NM_138287.3/NP_612144.1/GI:19923717(151636/Q8TDB6)。

[0152] “CCDC168”是指含有卷曲螺旋域的168,是一种具有卷曲螺旋域的蛋白质。除非另外明确地陈述,否则本文所用的CCDC168是指人类CCDC168,检索号NM_001146197.1/NP_001139669.1/GI:226246553(643677/Q8NDH2)。

[0153] “ZNF527”是指锌指蛋白 527,属于锌指蛋白家族。除非另外明确地陈述,否则本文所用的 ZNF527 是指人类 ZNF527,检索号 NM_032453.1/NP_115829/GI:149192840(84503/Q8NB42)。

[0154] “HRAS”是指 Harvey 大鼠肉瘤病毒致癌基因同系物,是一种小 G 蛋白,其活化 MAP 激酶路径。除非另外明确地陈述,否则本文所用的 HRAS 是指人类 HRAS,检索号 NM_005343.2/NM_176795.3NM_001130442.1/NP_001123914.1/GI:47117697/GI:194363760/GI:194363761(3265/P01112)。

[0155] “FAT1”是指 FAT1,一种原钙粘附蛋白,据报告可结合至 β -连环蛋白 (catenin) 且防止其核易位。除非另外明确地陈述,否则 FAT1 是指人类 FAT1,检索号 NM_005245.3/NP_005236/GI:75813622(2195/Q14517)。

[0156] 在本文中,对于任何所给基因仅列出一种基因检索号。应了解本发明包括与该基因有关的任何剪接形式。剪接形式在本文中意指单一基因的 mRNA 以选择方式剪接,导致单一基因的多种蛋白质变异体的表达。例如,Notch2 具有两种剪接变异体, NM_024408 和 NM_001200001。对于 Notch2,仅列出 NM_024408。

[0157] 如本文所用,“敏感性”意指细胞或患者对于 Wnt 抑制剂响应,其意为因 Wnt 抑制剂的作用导致延迟、停止、抑制肿瘤生长、侵袭或转移或达成肿瘤缩小或消退。在本发明的一个实施方式中,当用 10 至 100nM 化合物 A 处理细胞或患者样本 48 小时,如该细胞或患者样本对于治疗以大于 50% Axin2 减低反应 (Wnt 路径抑制) (例如 Axin2mRNA 或蛋白水平减低),则该细胞或患者样本对 Wnt 抑制剂具有“敏感性”。在一个特定的实施方式中,当用 50nM 化合物 A 处理细胞或患者样本 48 小时,如该细胞或患者样本对于治疗以 Axin2mRNA 含量减低大于 50% 反应,则该细胞或患者样本对 Wnt 抑制剂具有“敏感性”。

[0158] 当至少一种选自表 1 的生物标记物相较于对照组差异性地下调时,该细胞对 Wnt 抑制剂的抑制为“敏感性”或展现“敏感性”。或者,当在超过一种、超过两种、超过三种或整组生物标记物差异性表达时,该细胞对 Wnt 抑制剂的抑制为“敏感性”。

[0159] “对照组细胞”或“正常细胞”是指非癌性组织或细胞。

[0160] “对照组组织”或“正常组织”是指非癌性组织或细胞。

[0161] “对照组样本”或“正常样本”是指非癌性组织或细胞。

[0162] 如本文所用,“对照组”为对照组细胞、对照组组织或对照组样本中的生物标记物表达或描述与正常或健康生物标记物表达 (即正常非癌性细胞、样本或组织中的生物标记物表达) 充分相关联的值的参数或数值。

[0163] Notch1 “胞外域”在本文中氨基酸 1 至 1735 的 Notch1 区。

[0164] 术语“核酸”和“多核苷酸”可互换使用且是指任何长度的核苷酸聚合形式,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构且可执行任何功能。以下为多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段 (例如探针、引物、EST 或 SAGE 标签)、外显子、内含子、信使 RNA (mRNA)、转移 RNA、核糖体 RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包括修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。若存在,则对核苷酸结构的修饰可在聚合物组装之前或之后进行。核苷酸的序列可间杂非核苷酸组分。多核苷酸可进一步在聚合之后修饰,例如,通过与标记物组分结合。该术语也指双股分子和单股分子。除非

另外指明或另有需要,否则本发明的任何实施方式为:多核苷酸包括双股形式且包括已知或预测构成双股形式的两个互补单股形式。

[0165] “基因”是指包含至少一个可在转录和翻译之后编码特定多肽或蛋白质的开放读码框(ORF)的多核苷酸。多核苷酸序列可用于识别与其相关联的基因的较大片段或全长编码序列。本领域技术人员已知分离较大片段序列的方法。

[0166] “基因表达”、“基因产物”或“表达”在本文中均可互换使用,且是指当基因转录和翻译时所产生的核酸或氨基酸(例如肽或多肽)、生物标记物的DNA拷贝数、生物标记物的基因组DNA、cDNA或RNA序列;生物标记物基因表达、生物标记物蛋白质表达、生物标记物mRNA表达;生物标记物蛋白质的功能性效应;生物标记物基因、cDNA或mRNA的功能性效应;蛋白质、cDNA、基因或mRNA活性或其损失、或例如框移突变、缺失、易位、插入、复制、转化、功能性突变的突变状态;或其组合。

[0167] 在一个特定实施方式中,“基因表达”、“基因产物”或“表达”表示DNA表达、DNA拷贝数、mRNA表达、cDNA表达、蛋白质转录、蛋白质表达、DNA修饰、cDNA修饰、mRNA修饰、蛋白质修饰、DNA功能、cDNA功能、mRNA功能、蛋白质功能、DNA突变、cDNA突变、mRNA突变、蛋白质突变、或其组合;优选为DNA突变。DNA修饰包括DNA烷基化或酰化。例如,甲基化为涉及添加甲基到胞嘧啶或腺嘌呤DNA核苷酸的生化过程。mRNA修饰包括RNA编辑,该RNA编辑为涉及核苷酸在其由RNA聚合酶产生以形成序列之后的改变的生化过程。cDNA修饰包括在mRNA层级进行的翻译为cDNA修饰的任何修饰。蛋白质修饰包括涉及氨基酸在其经过翻译之后的改变的生化过程。蛋白质功能应理解为蛋白质进行由基因中编码的信息所特定的职责,包括信号转导、酶反应等的促进。

[0168] 术语“多肽”可与术语“蛋白质”互换使用且在其最广泛意义上是指两个或更多个氨基酸亚基、氨基酸类似物、或肽模拟物的化合物。这些亚基可由肽键键联。在另一个实施方式中,亚基可由其他键(例如,酯、醚等)键联。

[0169] 如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成氨基酸中的任何一者、和D和L光学异构体二者、氨基酸类似物和肽模拟物。如果肽链短,则三个或更多个氨基酸的肽通常称为寡肽。如果肽链长,则肽通常称为多肽或蛋白质。

[0170] 术语“分离的”意指与组分、细胞和其中多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段性质上通常相关联的分离。例如,分离的多核苷酸是自其通常在其天然或自然的环境中,例如在染色体上相关联的3'和5'邻接核苷酸相分离。如本领域技术人员所了解,非自然生成的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”以区分其与其自然生成的对应物。此外,“浓缩”、“分离”或“稀释”的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段可与其自然生成的对应物区分开,在于每体积中分子的浓度或数量在“浓缩”类型中比其自然生成的对应物的每体积中分子的浓度或数量大或在“分离”类型中比其自然生成的对应物的每体积中分子的浓度或数量小。其一级序列或例如其糖基化方式不同于自然生成的对应物的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要以分离的形式存在,这是因为其可通过其一级序列或者通过例如糖基化方式的另一特征与其自然生成的对应物区分。因此,非自然生成的多核苷酸是提供作为与分离的自然生成的多核苷酸分开的实施方式。提供产生于细菌细胞中的蛋白质作为与自其中本质上产生其的真核细胞分离的的自然生成的蛋白质分开的实施方式。

[0171] “探针”当在多核苷酸操作情况中使用是指一种提供作为可通过与靶杂交检测潜在性地存在于目标样本中的靶的试剂的寡核苷酸。通常,探针包括标记物或可在杂交反应之前或之后附着标记物的装置。适宜的标记物包括但不限于放射性同位素、荧光染料、化学发光化合物、染料和蛋白质(包括酶)。

[0172] “引物”为短多核苷酸,一般具有通过与靶杂交和之后促进与靶互补的多核苷酸的聚合,结合至潜在性地存于目标样本中的靶或“模板”的游离 3'-OH 基。“聚合酶链反应”(“PCR”)为其中复制复本是由靶多核苷酸使用由“上游”和“下游”引物组成的“引物对”或“引物组”、和聚合催化剂(例如 DNA 聚合酶,且通常是热稳定聚合酶)进行的反应。PCR 的方法为本领域中所熟知,且教导于例如 PCR:A Practical Approach, M. MacPherson 等人,牛津大学出版社下的 IRL 出版社(1991)中。产生多核苷酸的复制复本的所有方法例如 PCR 或基因克隆在本文中统称为“复制”。引物也可作用于杂交反应(例如南方或北方墨点分析法)中的探针(Sambrook 等人, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 2 版(1989))。

[0173] 如本文所用,“差异性表达”意指通常相较于对照组情况下的表达的可测量的差异。例如,当应用于基因时,其可指相较于正常细胞中的正常、野生型、功能性基因的基因的差异性突变状态。差异性突变的基因可相较于野生型基因突变,这会导致突变基因的功能损失。其也可指经由基因或由基因编码的蛋白产品转录和/或翻译的 mRNA 的差异性产生。经差异性表达的基因可相较于正常或对照组细胞的表达程度为过度表达或不足表达。然而,如本文所用,过度表达为基因表达的增加且一般是至少 1.25 倍、或至少 1.5 倍、或至少 2 倍、或至少 3 倍或至少 4 倍表达超过在正常或对照组对应物细胞或组织中所检测到的表达。如本文所用,不足表达为基因表达的减低且一般是至少 1.25 倍、或至少 1.5 倍、或至少 2 倍或至少 3 倍或至少 4 倍表达低于在正常或对照组对应物细胞或组织中所检测到的表达。术语“差异性表达”也指癌细胞或癌性组织中的表达与对照组(例如对照组细胞或正常组织,例如非癌性细胞或组织)中的表达不同的情况。作为一个实施例,若癌症样本中的表达是至少 1.25 倍、或至少 1.5 倍、或至少 2 倍或至少 3 倍或至少 4 倍低于对照组中的表达,则生物标记物是差异性表达或差异性地下调。

[0174] 基因的高表达水平可因为基因的过度表达或基因拷贝数的增加而发生。基因也可因负向调节物的失调或不存在转为增加的蛋白水平。

[0175] 术语“cDNA”是指互补 DNA,也就是,存在于细胞或生物体中的 mRNA 分子与例如逆转录酶的酶形成成为 cDNA。“cDNA 库”是存在于细胞或生物体中的所有 mRNA 分子的集合,均由酶逆转录酶转化为 cDNA 分子,接着插入至“载体”(可在添加外源性 DNA 后继续复制的其他 DNA 分子)中。库的示例性载体包括噬菌体(也称为“抗菌素”)、感染细菌的病毒(例如, λ 噬菌体)。库可被探测目标特异性 cDNA(以及因此 mRNA)。

[0176] 作为一个实施例,可通过使用例如 Affymetrix® HG-U133-Plus-2 基因芯片的基因芯片测量信使 RNA 含量来评估转录活性。大数目的目标基因的 RNA 的高通量即时定量因而在可再现系统中变为可能。

[0177] 术语“严苛杂交条件”是指使得核酸探针将特异性地杂交至其靶向子序列而不杂交至其他序列的条件。决定杂交严苛性的条件包括:温度、离子强度和例如甲酰胺的变性剂的浓度。改变这些因素中的一个因素会影响另一个因素且本领域普通技术人员当了解维持

所想要严苛度的条件的改变。高度严苛杂交的一个实施例为：0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠，在 65 至 68℃ 下或 0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠和 50% 甲酰胺，在 42℃ 下（参见 Sambrook, 上述）。“中等严苛”杂交的一个实施例为以下的条件：0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠，在 50 至 65℃ 下或 0.015M 氯化钠、0.0015M 柠檬酸钠和 20% 甲酰胺，在 37 至 50℃ 下。当在需要中等量的核酸失配时使用中等严苛条件。本领域普通技术人员应当了解洗涤为杂交条件的一部分。例如，洗涤条件可包括 0.2X 至 0.1X SSC/0.1% SDS 和 42 至 68℃ 的温度，其中增加的温度可增强洗涤条件的严苛性。

[0178] 当杂交以反向平行构型在两个单股多核苷酸之间发生时，反应称为“退火”并将那些多核苷酸描述作“互补”。若杂交可在第一多核苷酸和第二多核苷酸这些股的一者之间发生，则双股多核苷酸可与另一多核苷酸“互补”或“同系”。“互补”或“同系”（一种多核苷酸与另一种多核苷酸互补的程度）可依照大致上被接受的碱基配对原则根据预期彼此形成氢键结合的反向的股中碱基的比例量化。

[0179] 多核苷酸或多核苷酸区域（或多肽或多肽区域）具有特定百分比（例如，80%、85%、90%、95%、98% 或 99%）的与另一序列的“序列一致性”，意指当在比对时，在比较两种序列中该百分比的碱基（或氨基酸）是相同的。该比对和百分比同系或序列一致性可利用本领域中已知的软件程序，例如，述于 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel 等人编辑，(1987) 增刊 30, 第 7.7.18 部分，表 7.7.1 中确定。优选地，预设参数是用于比对。一种优选的比对程序为使用预设参数的 BLAST。具体地，优选的程序为 BLASTN 和 BLASTP，使用以下预设参数：遗传密码=标准；筛选=无；股=两股；截止=60；预期=10；矩阵=BLOSUM62；描述=50 序列；选择=高得分值；数据库=非冗余。

[0180] 本文中生物标记物包括基因变异体且具有至少 95% 序列一致性的基因。

[0181] 术语“细胞增殖性疾病”应包括特征是异常细胞生长和 / 或分裂或功能损失的正常生理功能的失调。“细胞增殖性疾病”的实例包括但不限于增殖、瘤形成、化生和各种自体免疫疾病（例如特征是 T 细胞凋亡的失调的那些）。

[0182] 如本文所用，术语“肿瘤性细胞”、“肿瘤性疾病”、“瘤形成”、“肿瘤”、“肿瘤细胞”、“癌症”和“癌细胞”（可互换使用）是指展现相对地自主生长使得其展现特征是细胞增殖的控制显著损失（也就是，失调的细胞分裂）的异常性生长表达型的细胞。肿瘤性细胞可为恶性或良性。转移性细胞或组织意指细胞可侵入并破坏邻近身体结构。

[0183] “头颈部癌症”或“头颈部鳞状细胞癌”可互换使用且是指出现于头部或颈部区域中的癌症¹⁶。其主要为鼻腔、鼻窦、唇、口、唾腺、喉 (throat/larynx) 的癌症。90% 的头颈部癌症被归类为头颈部鳞状细胞癌。其以发生率计为全球第六位癌症，全球每年有约 600,000 例。HNSCC 患者的 5 年存活率为约 40 至 50%。

[0184] “抑制肿瘤生长”指示肿瘤细胞生长的减慢，这可通过本领域中已知的任何方式来评估，包括但不限于测量肿瘤大小，利用 3H- 胸苷并入检测确定肿瘤细胞是否增殖，通过 FDG-PET（氟化脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描）成像测量葡萄糖吸收，或计数肿瘤细胞。“抑制”肿瘤细胞生长意指任何或所有以下状态：减慢、延缓和停止肿瘤生长以及肿瘤缩小。

[0185] “药物组合物”为活性剂和另一种惰性（例如，可检测试剂或标签）或活性载体（例如，化合物或组合物）（例如佐剂、稀释剂、黏结剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲油性溶剂、防腐剂等）的组合。载体也包括医药赋形剂和添加剂，例如：蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物

物（例如糖，包括单糖和寡糖；衍生糖，例如醛醇、醛酐、酯化糖等；和多糖或糖聚合物），其可单独或以组合方式（单独地或以组合方式占 1 至 99.99%（以重量或体积计））存在。碳水化合物赋形剂包括例如：单糖，例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等；二糖，例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖，例如棉籽糖、松三糖、麦芽糊精、葡聚糖、淀粉等；和醛醇，例如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇（葡萄糖醇）和肌醇。

[0186] 示例性蛋白质赋形剂包括血清白蛋白，例如人类血清白蛋白（HSA）、重组人类白蛋白（rHA）、明胶、酪蛋白等。也可在缓冲能力上发挥作用的代表性氨基酸 / 抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜（aspartame）等。

[0187] 术语“载剂”进一步包括缓冲剂或 pH 调节剂；通常，缓冲剂为从有机酸或碱制得的盐。代表性缓冲剂包括有机酸盐，例如柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐；Tris、氨基丁三醇盐酸盐或磷酸盐缓冲液。其他载剂包括聚合物赋形剂 / 添加剂，例如聚乙烯吡咯烷酮、聚蔗糖（一种聚合糖）、葡萄糖（例如环糊精，例如 2-羟丙基 - 正交 - 环糊精）、聚乙二醇、矫味剂、抗菌剂、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂（例如聚山梨糖醇酯，例如 TWEEN 20™ 和 TWEEN 80™）、脂质（例如磷脂、脂肪酸）、类固醇（例如胆固醇）和螯合剂（例如 EDTA）。

[0188] 如本文所用，术语“药学上可接受的载剂”包括任何标准药学载剂，例如经磷酸盐缓冲的盐水溶液、水和乳液（例如油 / 水或水 / 油乳液）和各种类型的润湿剂。这些组合物也可包括稳定剂和防腐剂和任何上述载剂，其额外限制条件为那些是体内可接受使用的。关于载剂、稳定剂和佐剂的实施例，请参见 Remington's Pharmaceutical Science, 第 15 版 (Mack Publ. Co., Easton (1975) 和 Physician's Desk Reference, 第 52 版, Medical Economics, Montvale, N. J. (1998)。

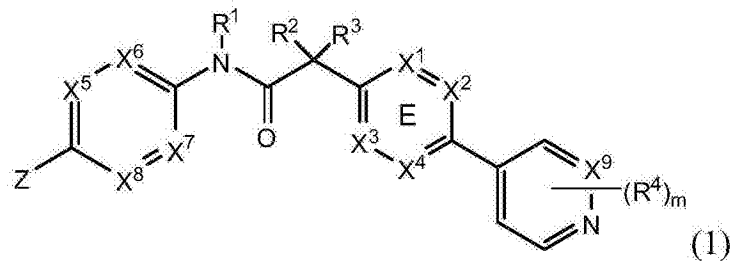
[0189] “有效量”为足以实现敏感性细胞或患者样本中有益或所想要的结果（例如，预防肿瘤生长）的量。其也可表示抑制 Wnt 路径的量。有效量可分一或多次施用、应用或给药。

[0190] “受试者”、“个体”或“患者”在本文中可互换使用，其是指脊椎动物，优选是哺乳动物，更优选是人。哺乳动物包括但不限于小鼠、猿、人、农场动物、竞技类动物和宠物。

[0191] 如本文所用，“Wnt 抑制剂”减低 Wnt 路径的活性。Wnt 抑制剂是可抑制 Wnt 信号传导路径的化合物，且包括 PORCN 抑制剂。该抑制可包括（例如）抑制 PORCN 和它的 Wnt 的棕榈酰基化、或降低包括卷曲蛋白和蓬乱蛋白的 Wnt 路径组分之间的缔合。优选地，Wnt 抑制剂为 PORCN 抑制剂。

[0192] 在一个具体的实施方式中，用于如本文所述的处理的 Wnt 抑制剂是如 W02010/101849A1 (PCT/US10/025813) 中所公开的任何适宜化合物，优选是式 (1) 的化合物：

[0193]



[0194] 或其生理上可接受的盐,其中:

[0195] 其中的 X^1 、 X^2 、 X^3 和 X^4 选自 N 和 CR⁷;

[0196] X^5 、 X^6 、 X^7 和 X^8 中的其中之一是 N 且其他为 CH;

[0197] X^9 选自 N 和 CH;

[0198] Z 选自苯基、吡嗪基、吡啶基、哒嗪基和哌嗪基;其中 Z 的各苯基、吡嗪基、吡啶基、哒嗪基或哌嗪基任选被 R⁶基取代;

[0199] R¹、R²和 R³为氢;

[0200] m 为 1;

[0201] R⁴选自氢、卤素、二氟甲基、三氟甲基和甲基;

[0202] R⁶选自氢、卤素和 -C(O)R¹⁰;其中 R¹⁰为甲基;和

[0203] R⁷选自氢、卤素、氰基、甲基和三氟甲基。

[0204] 具体地,该 Wnt 抑制剂可为选自下组的化合物:N-[5-(3-氟苯基)吡啶-2-基]-2-[5-甲基-6-(哒嗪-4-基)吡啶-3-基]乙酰胺;

[0205] 2-[5-甲基-6-(2-甲基吡啶-4-基)吡啶-3-基]-N-[5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基]乙酰胺;

[0206] N-(2,3'-联吡啶-6'-基)-2-(2',3-二甲基-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;

[0207] N-(5-(4-乙酰基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-2-(2'-甲基-3-(三氟甲基)-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;

[0208] N-(5-(4-乙酰基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-2-(2'-氟-3-甲基-2,4'-联吡啶-5-基)乙酰胺;和

[0209] 2-(2'-氟-3-甲基-2,4'-联吡啶-5-基)-N-(5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基)乙酰胺;

[0210] 或其药学上可接受的盐。

[0211] 在一个不同的实施方式中,该 Wnt 抑制剂为 2-[5-甲基-6-(2-甲基吡啶-4-基)吡啶-3-基]-N-[5-(吡嗪-2-基)吡啶-2-基]乙酰胺(化合物 A)。

[0212] 可依照本发明使用如 W02011/123785(PCT/US2011/030950)或 W02011/088123(PCT/US2011/020994)中所公开的其他 Wnt 抑制剂。

[0213] 本发明的详细陈述

[0214] 现已识别出多种基因可充当用于 Wnt 抑制剂的生物标记物。它们列于表 1 中。这些生物标记物可用于确定癌症患者对抑制剂的敏感性且有助于监测接受治疗的这些患者的反应。另外,明确定义的生物标记物可指示哪位患者应接受治疗,也就是,可用于患者分级并增加化合物将最终引起患者响应的机会。它容许较及时且积极的治疗,与试验和误差方法相反。这些生物标记物也可用于监测治疗的有效性。若生物标记物指示患者已变为对

该治疗不敏感,则施用剂量可增加、减少、完全停药或改用另一种治疗施用。因此,所识别的生物标记物(即,选自表1的任何生物标记物)是与Wnt抑制剂或PORCN抑制剂相关联的适宜生物标记物。使用这些生物标记物的方法确保恰当患者接受适宜的治疗且在治疗过程中患者可被监测其持续的Wnt(特别是PORCN)抑制剂敏感性。治疗方法中的癌症患者可根据其对Wnt抑制剂的敏感性选择性地获得治疗。这些生物标记物是通过在细胞系和小鼠异种移植中进行实验来识别,或基于生物信息分析来确定。

[0215] 一或多种本文所识别生物标记物的基因表达的减少可用于确定患者对任何Wnt抑制剂的敏感性,例如,生物标记物的减少或过度表达指示癌症患者对Wnt抑制剂(特别是化合物A)的施用敏感且将有利地响应Wnt抑制剂(特别是化合物A)的施用。作为另一个实施例,在利用Wnt抑制剂治疗之后,可获得患者样本并检测该样本的敏感性以发现该患者是否仍旧对Wnt抑制剂的治疗敏感。或者,可检测超过一种选自表1的生物标记物的组合以获得该结果。以Wnt抑制剂(特别是如本文所定义的那些,尤其是化合物A)的治疗可以是选择性的。这意指仅被识别为敏感的这些患者或极有可能响应Wnt抑制剂治疗的这些患者接受Wnt抑制剂。其他可任选接受其他药物的替代治疗。

[0216] 已确定这些生物标记物在患者样本中在治疗之前或治疗之后相较于对照组样本的基因表达的变化(包括活性或功能的损失或增益)可指示患者响应于Wnt抑制剂的治疗。例如,Wnt抑制剂可为化合物A。更具体地,WNT11、WNT10A、WNT3、WNT7A在患者样本中较对照组更高的表达指示患者对Wnt抑制剂的治疗更可能敏感。另一方面,患者对Wnt抑制剂的治疗更可能敏感是由AXIN2、LEF1、NKD1的表达相较于对照组表达减少所指示。若Notch1、Notch2或Notch3表达减少,或具体地,若其活性或功能相较于对照组减低,则其指示患者对Wnt抑制剂的治疗更可能敏感。该活性或功能可能是因突变引起。相较于对照组,在患者样本中检测到较低的SFRP2、FRZB、SFRP4或DKK2表达,可指示患者对Wnt抑制剂的治疗的敏感性。相较于对照组水平,FAM58A、FLJ43860、CDKN2A、CCDC168、ZNF527、FAT1、OR7G3或DTX3L的较低表达,特别是其功能损失,可指示患者将极有可能响应Wnt抑制剂的治疗。当患者样本显示较对照组HRAS的更高表达(特别是功能增益)时,患者对Wnt抑制剂的治疗敏感的可能性更大。

[0217] 已证实头颈癌细胞高度响应于Wnt抑制剂。患有头颈部癌症的癌症患者可自Wnt抑制剂的治疗获益。一般而言,本发明的化合物将以治疗有效量经由本领域中已知的任何常用且可接受的模式单独或以与一或多种治疗剂组合方式施用。治疗有效量可广泛地改变,取决于疾病的严重度、个体的年龄和相对健康状态、所使用化合物的效力和其他因素。一般而言,指示以约0.03至2.5mg/kg体重的日剂量可全身性地获得令人满意的结果。较大哺乳动物(例如人)中的所指示日剂量在自约0.5mg至约100mg范围内,可方便地施用,例如,以多达一天四次的分次剂量。用于口服的适宜单位剂型包含约1至50mg活性成分。

[0218] 患有相较于对照组出现选自表1的生物标记物的差异性下调表达的头颈部癌症的患者,尤其可自Wnt抑制剂(优选是化合物A)的治疗获益。这患者响应的可能性为最高。出于相同原因,也可治疗罹患其他肿瘤类型的患者,只要相较于对照组在其癌症样本中选自表1的生物标记物的差异性表达下调。一旦开始Wnt抑制剂治疗,则抑制剂的有效性可通过Axin2、LEF1和/或NKD1的差异性表达与对Wnt抑制剂敏感的癌症样本中的表达的比较监测。通常,如果Wnt抑制剂有效,则Axin2、LEF1和/或NKD1的表达达成下调。Axin2、

LEF1 和 / 或 NKD1 的不足的下调表达指示需要调整剂量,或可必需将 Wnt 抑制剂与另一种抗肿瘤药剂组合。

[0219] 基因表达的测量

[0220] 基因表达的检测可通过任何适宜方法进行,包括(例如)检测由基因转录的 mRNA 的量或由自基因转录的 mRNA 的逆转录所产生的 cDNA 的量或由基因编码的多肽或蛋白质的量。这些方法可在样本上通过样本基础地或经改动达成高通量的分析进行。例如,使用 Affymetrix™ U133 微阵列芯片。

[0221] 在一个方面,基因表达通过与会与该生物标记物的适宜探针特异性杂交的探针杂交来检测并定量化。也可利用本领域中已知的方法将这些探针附着至用于高通量筛选试验中的固体载体。例如,WO 97/10365 和美国专利案第 5,405,783 号、第 5,412,087 号和第 5,445,934 号公开可包含一或多种本文所公开序列的高密度寡核苷酸芯片的构造。利用公开于美国专利案第 5,405,783 号、第 5,412,087 号和第 5,445,934 号中的方法,在衍生的玻璃表面上合成本发明的探针。经光保护的核苷亚磷酸酰胺偶联至玻璃表面,选择性地通过光解经由光刻遮罩去除保护,并与第二个经保护的核苷亚磷酸酰胺反应。重复偶联 / 去除保护过程直到完成期望的探针。

[0222] 在一个方面,基因的表达水平是通过使核酸样本暴露于探针修饰芯片来确定。提取的核酸是例如通过荧光标签优选在扩增步骤中进行标记。经标记样本的杂交适宜以严苛水平进行。使用检测装置定量地测定探针-核酸杂交的程度。参见美国专利案第 5,578,832 号和第 5,631,734 号。

[0223] 或者,可利用已知的技术测定基因拷贝数、转录或翻译中的任何一者。例如 PCR 的扩增方法可能是有用的。PCR 的一般程序教导于 MacPherson 等人,PCR:A Practical Approach(牛津大学出版社下的 IRL 出版社(1991))中。然而,用于各应用反应的 PCR 条件是以经验方式确定。许多参数会影响反应的成功。其中包括退火温度及时间、延伸时间、Mg²⁺ 和 / 或 ATP 浓度、pH 以及引物、模板和脱氧核糖核苷酸的相对浓度。在扩增之后,可通过琼脂糖凝胶电泳,接着利用溴化乙锭染色剂和紫外光照射进行目测,以检测所得 DNA 片段。

[0224] 在一个实施方式中,通过检测一或多个附着至样本核酸的标记来检测经杂交的核酸。这些标记可依本领域技术人员所熟知的多种方法中的任一种并入。然而,在一个方面中,标记是在制备样本核酸的扩增步骤期间同时地并入。因此,例如,利用经标记物引物或经标记核苷酸的聚合酶链反应 (PCR) 将提供经标记扩增产物。在另一个实施方式中,如上所述使用经标记核苷酸(例如荧光素标记的 UTP 和 / 或 CTP) 的转录扩增可将标记并入至经转录的核酸中。

[0225] 或者,标记可直接地添加到初始核酸样本(例如,mRNA、polyA、mRNA、cDNA 等)或可在完成扩增之后添加到扩增产物。将标记附着至核酸的方法是本领域技术人员所熟知的且包括(例如)缺口平移或末端标记(例如利用经标记的 RNA),其是通过激酶化核酸且在随后进行接合样本核酸与标记(例如,荧光团)的核酸连接子的附着(连接)。

[0226] 适用于本发明的可检测标记包括可通过光谱方法、光化学方法、生物化学方法、免疫化学方法、电方法、光学方法或化学方法检测的任何组合物。在本发明中的有用的标记包括用于利用经标记的链霉亲和素共轭物染色的生物素、磁性珠粒(例如,Dynabeads™)、荧光染料(例如,荧光素、德克萨斯红(texas red)、玫瑰红、绿色荧光蛋白质、等)、放射性标

记（例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、或 ^{32}P ）、酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和通常用于 ELISA 中的其他酶）、和热量标记（例如胶态金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等）珠粒）。教导这些标记的用途的专利案包括美国专利案第 3,817,837 号；第 3,850,752 号；第 3,939,350 号；第 3,996,345 号；第 4,277,437 号；第 4,275,149 号；和第 4,366,241 号。

[0227] 本领域技术人员熟知标记的检测。因此，例如，可使用照相软片或闪烁计数器检测放射性标记，可使用检测发射光的光检测器检测荧光标记物。通常通过提供具有底物的酶和检测由酶对底物作用所产生的反应产物检测酶标记，并通过简单地观察有色标记检测热量标记。

[0228] 可检测的标记可在杂交之前或之后被添加至靶（样本）核酸，正如 WO 97/10365 中所述。这些可检测标记是在杂交之前直接附着或并入到靶（样本）核酸。相反地，“间接标记”是在杂交之后接合至杂交双螺旋。一般而言，间接标记是附着到已在杂交之前附着至靶核酸的结合部分。例如，靶核酸可在杂交之前生物素化。在杂交之后，与抗生物素蛋白（avidin）共轭的荧光团将会结合带有提供容易检测到的标记的杂交双螺旋的生物素。关于标记核酸和检测经标记杂交核酸的方法的详细评论，请参见 *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 第 24 卷:Hybridization with Nucleic Acid Probes, P. Tijssen 编辑 Elsevier, 纽约 (1993)。

[0229] 多肽的检测

[0230] 生物标记物的表达水平也可通过检测至少一种选自表 1 的生物标记物的蛋白质表达或蛋白质产物来确定。蛋白含量的确定涉及测量发生在可选择性地识别和结合获自患者的样本中生物标记物的多肽的抗体间的任何免疫特异性结合的量 and 比较该量与对照组样本中至少一种生物标记物的免疫特异性结合的量。该生物标记物的蛋白质表达的量相较于对照组表达可能增加或减少。或者，可分析超过一种选自表 1 的生物标记物的组合。

[0231] 在蛋白质分析领域中有多种技术可用。那些包括但不限于放射免疫测定、ELISA（酶联免疫吸附测定）、“夹心”免疫测定、免疫放射量测定、原位免疫测定（使用例如胶态金、酶或放射性同位素标记）、西方墨点分析、免疫沉淀测定、免疫荧光测定、流式细胞计数法、免疫组织化学、共焦显微镜法、酶测定、表面等离子波共振和 PAGE-SDS。

[0232] 生物标记物的检测和 Wnt 抑制剂的治疗

[0233] 一旦已经预测患者对 Wnt 抑制剂敏感，则可在整个治疗过程中以一次给药、连续或断续地实施向患者施用任何 Wnt 抑制剂。确定最有效的施用装置和剂量的方法为本领域普通技术人员所熟知且随用于治疗组合物的、治疗的目的、进行治疗的靶细胞和进行治疗的个体而改变。单一或多次施用可以根据治疗医师所选剂量和方式进行。可凭经验调整适宜的剂量配方和施用药剂的方法。

[0234] 可在施用 Wnt 抑制剂之后检测至少一种选自表 1 的生物标记物以确定患者是否仍旧对 Wnt 抑制剂的治疗敏感。此外，可在单次施用抑制剂之后的多个时间点检测至少一种生物标记物。例如，施用初始一丸 Wnt 抑制剂，在首次治疗后 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、8 小时、16 小时、24 小时、48 小时、3 天、1 周或 1 个月或数月检测至少一种生物标记物。或者，超过一种（例如 2 种、3 种、4 种、5 种或所有）选自表 1 的生物标记物可一起检测。

[0235] 可在每次施用 Wnt 抑制剂之后检测该至少一种选自表 1 的生物标记物，因此，若存

在 Wnt 抑制剂的多次施用,则可在每次施用之后检测该至少一种生物标记物以确定持续的患者敏感性。患者会经历 Wnt 抑制剂的多次施用以及接着在不同时间点检测这些生物标记物。例如,治疗过程可能需要施用初始剂量、经过特定时段后的第二剂量和再在第二次给药数小时后的第三剂量的 Wnt 抑制剂。可在施用各剂量的 Wnt 抑制剂后 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、8 小时、16 小时、24 小时、48 小时、3 天、1 周或 1 个月或数月检测至少一种生物标记物。或者,超过一种(例如 2 种、3 种、4 种、5 种或所有)选自表 1 的生物标记物可一起进行检测。

[0236] 本发明范畴中也包括在不同时间点检测不同生物标记物。在不受任一理论约束下,归因于 Wnt 抑制剂或生物标记物的作用机制,对 Wnt 抑制剂的响应延迟并在施用后的任何时间检测至少一种生物标记物以确定患者是否仍旧对药物的施用敏感。在每次施用 Wnt 抑制剂后对至少一种选自表 1 的生物标记物的检测将提供关于方法、剂量和治疗过程的指导。

[0237] 最后,存在施用不同 Wnt 抑制剂并接着检测至少一种选自表 1 的生物标记物。在该实施方式中,超过一种 Wnt 抑制剂被选择并施用给该患者。可接着在施用每次不同的 Wnt 抑制剂之后检测至少一种选自表 1 的生物标记物。如上述,该试验也可在施用不同 Wnt 抑制剂后的多个时间点进行。例如,可施用第一 Wnt 抑制剂给患者并在施用后 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、8 小时、16 小时、24 小时、48 小时、3 天、1 周或 1 个月或数月检测至少一种生物标记物。可接着施用第二抑制剂并再次在施用第二 Wnt 抑制剂后 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、8 小时、16 小时、24 小时、48 小时、3 天、1 周或 1 个月或数月检测至少一种生物标记物。或者,超过一种(例如 2 种、3 种、4 种、5 种或所有)选自表 1 的生物标记物可一起进行检测。

[0238] 本发明的另一个方面提供一种评估 Wnt 抑制剂的适宜剂量水平的方法,该方法包括在施用 Wnt 抑制剂之后监测至少一种生物标记物的差异性表达。例如,在施用第一丸 Wnt 抑制剂之后,分析至少一种生物标记物并基于该结果建议增加或减少 Wnt 抑制剂剂量。在施用经调整剂量的 Wnt 抑制剂之后,至少一种生物标记物的分析将可确定患者是否仍旧对经调整的剂量敏感以及该经调整的剂量是否提供预期的效果,例如,抑制肿瘤生长。或者,超过一种(例如 2 种、3 种、4 种、5 种或所有)选自表 1 的生物标记物可一起进行检测,以评估对 Wnt 抑制剂的剂量的敏感性。

[0239] 在评估最初具敏感性的肿瘤中 Wnt 抑制剂的延时效力的所有实施方式的替代实施方式中,可将 NKD1、LEF1 和 / 或 Axin2 的差异性表达与敏感性肿瘤样本中的表达进行比较。敏感性肿瘤样本也定义为通过 50nM 化合物 A 的治疗 48 小时时显示 Axin2 减少 (Wnt 路径抑制) 大于 50% 的肿瘤。

[0240] 可制得用于评估任何 Wnt 抑制剂的活性的试剂盒。例如,包括用于选自表 1 的生物标记物的 PCR 或微阵列杂交的核酸引物的试剂盒可用于评估对 Wnt 抑制剂的敏感性。或者,与用于至少一种生物标记物的抗体一起提供的试剂盒可适用于检测对 Wnt 抑制剂的敏感性。

[0241] 本领域中熟知癌症可变为抗化疗治疗,尤其在该治疗为长期的情况下。至少一种选自表 1 的生物标记物的差异性表达的检测可在利用任何化疗剂的长期治疗之后进行,以确定癌症是否对 Wnt 抑制剂敏感。若患者先前已经经另一种化疗剂或另一种 Wnt 抑制剂治

疗,则这就是患者检测至少一种选自表 1 的生物标记物以确定肿瘤是否对 Wnt 抑制剂敏感的有用信息。该检测可尤其有益于患者,如果其癌症经历缓解且接着再生长或已转移至不同部位。

[0242] 对 Wnt 抑制剂的筛选

[0243] 可检测至少一种选自表 1 的生物标记物以筛选其他 Wnt 抑制剂。该方法包括检测具有至少一种生物标记物的细胞,预测若细胞对候选 Wnt 抑制剂敏感,则接着使该细胞与该候选 Wnt 抑制剂接触和比较经处理的细胞的 IC_{50} 与接触敏感性细胞的已知 Wnt 抑制剂。例如,就预测为如通过至少一种生物标记物的差异性表达所确定的对任何 Wnt 抑制剂敏感的细胞而言,候选 Wnt 抑制剂将具有 $IC_{50} \leq 3 \mu M$ 。至少一种生物标记物表达的测量可通过上述方法(例如 PCR 或微阵列分析)进行。或者,可基于这目的检测超过一种的生物标记物的组合。

[0244] 表 1

[0245]

基因名称 (化合物)	检索号	SEQ ID NO. (核苷酸/蛋白质)
Notch1	NM_017617.3/NP_060087/GI:148833508	4851/P46531
Notch2	NM_024408.3/NP_077719/GI:24041035	4853/Q04721
Notch3	NM_000435.2/NP_000426/GI:134244285	4854/Q9UM47
AXIN2	NM_004655.3/NP_004646/GI:195927059	8313/Q9Y2T1
LEF1	NM_016269/NP_001124185/GI:7705917	51176/Q9UJU2
NKD1	NM_033119/NP_149110/GI:14916433	85407/Q969G9

[0246]

SFRP2	NM_003013.2/NP_003004/GI:48475052	6423/Q96HF1
FRZB	NM_001463.3/NP_001454/GI:38455388	2487/Q92765
SFRP4	NM_003014.3/NP_003005/GI:170784838	6424/Q6FHJ7
DKK2	NM_014421.2/NP_055236/GI:7657023	27123/Q9UBU2
FAM58A	NM_152274.3/NP_689487/GI:196049382	92002/Q8N1B3
FLJ43860	NM_207414.2/NP_997297/GI:148727311	389690/Q6ZUA9
OR7G3	NM_001001958.1/NP_001001958/GI:50080201	390883/Q8NG95
CCDC168	NM_001146197.1/NP_001139669.1/GI:226246553	643677/Q8NDH2
ZNF527	NM_032453.1/NP_115829/GI:149192840	84503/Q8NB42
CDKN2A	NM_000077.4/NP_478104/GI:4502749	1029/P42771
OR7G3	NM_001001958.1/NP_001001958/GI:50080201	390883/Q8NG95
WNT11	NM_004626.2/NP_004617/GI:17017974	7481/O96014
WNT10A	NM_025216.2/NP_079492/GI:16936520	80326/Q9GZT5
WNT3	NM_030753.3/NP_110380/GI:13540477	7473/P56703
WNT7A	NM_004625.3/NP_004616/GI:17505191	7476/O00755
DTX3L	NM_138287.3/NP_612144.1/GI:19923717	151636/Q8TDB6
HRAS	NM_005343.2/NM_176795.3 NM_001130442.1/NP_001123914.1/GI:47117697/GI: 194363760/GI:194363761	3265/P01112
FAT1	NM_005245.3/NP_005236/GI:75813622	2195/Q14517

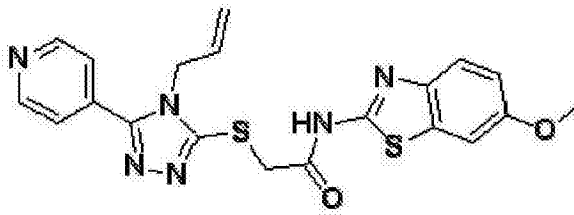
[0247] 实施例

[0248] 实施例 1 : 化合物 A 和化合物 B (分别为图 1A 和 1B) 为生化和细胞检测中的有效 PORCN 抑制剂。

[0249] 放射性配体结合检测 : 膜制备 : 使用 Fugene 6 (Roche), 利用带有人类 PORCN 的 pcDNA 3.1 结构 (Invitrogen) 转染约 10^8 个 293 细胞。在 48 小时后, 通过在 PBS 中刮削来收获细胞, 以 $1,000 \times g$ 离心 10 分钟。对缓冲液吸气。在干冰浴中冷冻细胞小球, 接着轻柔地再悬浮于 10ml 含有无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物的 50mM Tris pH 7.5、250mM 蔗糖缓冲液 (Sigma) 中。使用 polytron (Brinkman) 裂解细胞。在 4°C 以 $1,600 \times g$ 将裂解细胞离心 20 分钟, 转移上清液并在 4°C 下在 SS34 转子中以 20,000rpm 离心 20 分钟。弃置上清液, 使用三个利用 Polytron 的 10 秒脉冲, 将这些小球再悬浮于 10% 蔗糖、50mM Tris pH 7.5、5mM MgCl_2 、1mM EDTA 溶液中。

[0250] 化合物 B 的放射性配体标记物 : 化合物 C, 其结构列于下方,

[0251]



[0252] 经由由 AmBioslabs 进行的氢化反应放射性标记化合物 C, 以制得 ^3H - 放射性标记物的化合物 B。

[0253] 放射性配体结合检测: 利用上述膜制剂, 如下进行过滤结合检测。为减低非特异性结合, 如制造商建议利用 0.1% BSA 预涂覆 96 孔过滤盘 (PerkinElmer) 且接着利用 0.1% BSA 洗涤四次。在室温下, 在聚丙烯 96 孔盘中, 结合缓冲液 (50mM Tris pH 7.5、5mM MgCl_2 、1mM EDTA、0.1% 牛血清白蛋白) 加上无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma) 中在存在或不存在化合物 A 下, 利用 6.6nM ^3H - 化合物 B 以 150 μl 的最终体积培养膜制剂 (50 μg 总蛋白质) 3 小时。接着将结合反应混合物转移至经预涂覆的 96 孔过滤盘 (PerkinElmer), 使用 96- 针 FilterMate 收获器 (PerkinElmer) 过滤和洗涤。使用微盘闪烁计数器 TopCount (PerkinElmer) 获得放射性信号。通过 TopCount (PerkinElmer) 测定放射性配体 PORCN 结合活性。利用 Prism 进行曲线拟合。

[0254] 如图 2A 所显示, 经氚标记的化合物 B 大量地结合至自经 PORCN 转染的 293 细胞的膜制剂而不结合至自无 Wnt 或载体对照组转染细胞的那些, 这表明化合物 B 特异性地与 PORCN 相互作用。另外, 化合物 B 和 PORCN 之间的特异性相互作用可被未经标记的化合物 B 竞争消除 (图 2A)。化合物 B 结合至 PORCN 和充当体外生物化学 PORCN 结合检测中用于与冷测试化合物竞争的热放射性配体。在使用 ^3H - 化合物 B 的与 PORCN 的放射性配体结合检测中, 化合物 A 显示 1nM 的 IC_{50} (图 2B)。

[0255] 实施例 2: 通过化合物 A 抑制 PORCN 阻断体外 Wnt 信号传导

[0256] 报告基因检测: 在 37°C 与 5% CO_2 的空气氛围中, 将小鼠睾丸间质 (Leydig) 细胞 TM3 细胞 (获自美国菌种培养物收集中心 (American Type Culture Collection), ATCC, 维吉尼亚州马纳萨斯) 培养于补充 2.5% FBS (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德) 和 5% 马血清 (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德)、50 单位 /mL 青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素 (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德) 的汉姆氏 (Ham's) F12 培养基和杜贝卡氏改良依格培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德) 的 1:1 混合物中。在 10cm 培养皿中的 TM3 细胞是遵循制造商协定, 通过 8 μg 的包含由 Wnt 响应性元素所驱动的萤光素酶基因的 STF- 报告子质粒和 2 μg pcDNA3.1-Neo (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德) 与 30 μL FuGENE6 (Roche Diagnostics, 印第安纳州印第安纳波里斯) 共转染。通过 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德) 筛选稳定细胞系 (TM3Wnt-Luc)。在 37°C 与 5% CO_2 的空气氛围中, 将 TM3Wnt-Luc 细胞和 L- 细胞 Wnt3A 细胞 (获自美国菌种培养物收集中心, ATCC, 维吉尼亚州马纳萨斯) 培养于补充 10% FBS (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德) 和 50 单位 /mL 青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素 (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德) 的杜贝卡氏改良依格培养基 (Gibco/Invitrogen, 加州卡尔斯巴德) 中, 是经胰蛋白酶化和共培养于含补充 2% FBS 的 DMEM 培养基的 384 孔

盘中,和通过不同浓度的本发明化合物处理。在 24 小时后,通过 Bright-Glo™ 萤光素酶检测系统 (Promega, 威斯康辛州麦迪逊) 检测萤火虫萤光素酶活性。当在化合物的效应使得发光信号减少 50% 时,测得 IC₅₀。

[0257] 化合物 A 有效地抑制 Wnt 共培养检测中的 Wnt 信号传导, IC₅₀ 为 0.4nM (图 3A)。该抑制效应是通过添加经过外源 Wnt3A 调节的培养基恢复 (图 3B)。为进一步证实其在 PORCN 依赖性 Wnt 分泌中的功能,通过 HA 标记物的 Wnt3a (HA-Wnt3A) 转染 293A 细胞和利用多种剂量的化合物 A 处理。如图 4 所显示,化合物 A 有效地减低上清液中 HA-Wnt3A 的丰度同时保留溶胞产物 HA-Wnt3A,这表明 Wnt3A 分泌实质上是以剂量依赖性方式受化合物 A 抑制。所分泌的 Wnt 在随后作用于 Wnt 接收细胞,这导致 Wnt 共报告子 LRP6 的磷酸化。使用自分泌 L-Wnt3A 细胞 (一种过度表达 Wnt3A 的小鼠乳腺细胞系),我们证实化合物 A 实际上强烈地阻断 LRP6 (低密度脂蛋白受体相关蛋白质 6) 的 Wnt 依赖性磷酸化 (图 5A)。据报告 PORCN 会影响泛 -Wnt 翻译后棕榈酰基化^{17 18}。在推定 Wnt 棕榈酰基化位点 Ser209 周围的残基保留于所有 19 种 Wnt 当中 (图 5B),且在整个蛋白质组的任何其他蛋白质中未识别出 CHGxSGSC 棕榈酰基化基元。为测试化合物 A 是否可从基因方面概括 PORCN 的损失的结果,我们在 Wnt 依赖性 STF 报告子检测中专注于一组典型的 Wnt,包括 Wnt1、2、3、3A、6、7A、和 9A。如图 5C 所显示,化合物 A 证实对所有测试 Wnt 的相当的抑制活性,这点与 PORCN 表达型的损失一致。另外,化合物 A 直至 20 μM 时未在细胞中显示明显细胞毒性。

[0258] 实施例 3:人头颈癌细胞系中 Wnt 抑制剂的细胞功能性效应

[0259] 为识别出响应豪猪抑制的人癌细胞系,我们使用 AXIN2 的 mRNA 表达水平作为读出,对超过 300 种细胞系进行特征分析。在 37°C 与 5% CO₂ 下的增湿培养箱中培养所有细胞系。HN30 细胞 (韦恩州立大学 (Wayne State University)) 和 UMSCC 细胞 (密歇根大学 (University of Michigan)) 是衍生自人头颈鳞状细胞癌 (HNSCC) 患者肿瘤样本。分别地,依照制造商指令,使用 Qiagen RNeasy 和 DNeasy 血液和组织试剂盒分离总 RNA 或 DNA。简而言之,通过添加缓冲剂 RLT 破坏细胞和使用 QIAshredder 旋转管柱均质化。在添加一体积 70% 乙醇至均质化溶胞产物和彻底混合之后,将这些样本转移至 RNeasy 旋转管柱。在离心之后弃置溢流。在利用缓冲剂 RW1 和缓冲剂 RPE 洗涤 RNeasy 旋转管柱两次之后,通过利用无 RNA 酶水洗脱 RNeasy 旋转管柱以收集 RNA 样本。对于 TaqMan 检测,每孔 2×10⁶ 个细胞接种于 6 孔细胞培养盘中且以 5 μM 作为最高最终浓度开始的多点剂量响应中利用或不利用化合物处理。在 48 小时后,收集 RNA 样本。

[0260] 响应性细胞系是定义为在利用 10 至 100nM 化合物 A 处理 48 小时后,优选在利用 50nM 化合物 A 处理 48 小时后达成 AXIN2mRNA 减少大于 50%。如图 6 所显示,头颈部癌症细胞 (HNSCC) 系属于响应化合物 A 的前几种癌症类型。在 HNSCC 细胞系当中,96 种中有 31 种在化合物 A 的处理后显示路径抑制 (图 7)。

[0261] 为了关联路径抑制与细胞功能,将人 HNSCC 细胞系 HN30 用于进一步的体外和体内特征分析。对于菌落形成检测,每孔 2×10³ 个细胞接种于经过或不经过化合物处理的 6 孔细胞培养盘中。在一周后利用结晶紫染色细胞。

[0262] 化合物 A 有效地抑制 HN30 中的 Wnt 依赖性 AXIN2 信息产生, IC₅₀ 为 0.3nM (图 8A)。其强烈地减低 HN30 菌落形成,但 IC₅₀ 右移 (图 8B)。通过化合物 A 减低的菌落形成效应可部分地通过显性 β-连环蛋白的过度表达恢复 (图 9A)。为进一步证实化合物 A 的细胞效应

是否是归因于PORCN依赖性Wnt信号传导活性的抑制,进行shRNA实验。对PORCN的shRNA实质上抑制Wnt靶基因AXIN2的表达(图9B)和体外HN30细胞的菌落形成(图9C),与化合物A数据一致。

[0263] 实施例4:Wnt抑制剂在Wnt依赖性人HNSCC的小鼠模型中的效力

[0264] 为测试化合物A的抗肿瘤活性,建立HNSCC HN30的小鼠异种移植模型。依照肿瘤体积随机分组带有HN30肿瘤的裸小鼠。化合物A是在10%柠檬酸盐缓冲液pH 2.8/90%柠檬酸盐缓冲液pH 3.0或0.5%MC/0.5%吐温(Tween)80中调配并通过经口强饲以10 μ L/g动物体重的给药体积施用。每日监测体重且一旦肿瘤可触摸到,则每周三次地评估肿瘤大小。通过利用测径器测量确定肿瘤大小。利用公式(长度 \times 宽度 \times 高度)/2计算得肿瘤体积。在第14天测定带有肿瘤的裸小鼠(n=2/给药组)中的血浆浓度和化合物A的暴露量。在给药后第1、3、7、16和24小时通过连续眼窝采样采集血液样本(50 μ L)。将这些血液样本离心,分离血浆并冷冻直到完成LC/MS/MS分析。

[0265] 如图10A所显示,当每天一次地给药时,化合物A诱导剂量依赖性效力。测量治疗组(T)和对照组(C)各组的肿瘤重量改变并用于计算由T/C比表示的生长延迟。在14天的治疗之后,0.1mg/kg的剂量导致中度肿瘤生长延迟(T/C:69%),和0.3mg/kg的剂量明显地抑制肿瘤生长(T/C:26%),和1.0和3.0mg/kg的剂量导致实质的肿瘤消退(T/C:分别为-31%和-50%)(图10A)。疗法具良好耐受性且无明显的动物体重损失。当每天两次地给药时,在这模型中获得类似的结果,0.5mg/kg的剂量每天两次获得-44% T/C。

[0266] 利用AXIN2mRNA和pLRP6水平(如实施例3所确定)作为关联HN30小鼠异种移植模型中抗肿瘤活性观察值的药效动力学标记物。在化合物A 3mg/kg的单次剂量之后,肿瘤中的AXIN2mRNA表达水平在给药后第5至第10小时期间减低~60至95%且在第16小时时效应开始降低同时减低药物浓度(图10B)。在峰值药物浓度(第1小时)和最大AXIN2mRNA抑制(第10小时)之间观测到时间延迟。另外,如图10C所显示,HN30肿瘤中的pLRP6水平实质上以时间依赖性方式减低。在给药后第7至10小时达到最大效应,到第24小时pLRP6水平大致恢复为正常值。化合物A的治疗也导致LEF1的84%下调和NKD1的67%下调。该药物动力学(PK)、PD和效力关系说明持续路径抑制对于诱导这HN30异种移植模型中的肿瘤消退并非必需的,这可提供肿瘤与正常组织之间的重要差异因子以达成治疗窗。结论是Wnt抑制剂(特别是化合物A)可用于治疗头颈部癌症。

[0267] 实施例5:通过评估Notch1、Notch2、Notch3、LEF1、NKD1、SFRP2、FRZB、SFRP4和DKK2的基因表达预测人原发性肿瘤小鼠异种移植模型和人原发性肿瘤的Wnt抑制剂敏感性:

[0268] 为了研究通过化合物A体内处理所调节的其他Wnt相关基因,TaqMan® GeneCard分析显示包括LEF1和NKD1的若干种其他已知Wnt靶基因以及包括Wnt3和Wnt9B的Wnt配体的下调。

[0269] 为此,在PTC-200帕耳帖热循环仪(MJ Research)和ABI PRISM 7900HT序列检测系统(Applied Biosystems)上进行两步骤TaqMan RT-PCR分析。首先,使用大容量cDNA Archive试剂盒(Applied Biosystems)依照制造商指令合成cDNA。简而言之,通过使大容量cDNA Archive试剂盒的非酶催化、酶催化组分与分离的RNA样本混合,准备RT反应,接着使用热循环仪进行25 $^{\circ}$ C下10min和37 $^{\circ}$ C下120min的级联式培养。其次,使用TaqMan

通用型主要 (Universal Master) 混合物 (Applied Biosystems) 和 AXIN2 和 GAPDH 探针 (Applied Biosystems) 依照制造商指令进行 TaqMan 分析。简而言之,通过使通用型主要混合物、TaqMan 探针和合成 cDNA 样本混合,准备 PCR 反应。PCR 循环如下:95°C 维持 10min 和 40 个 95°C 维持 15 秒和 60°C 维持 1min 的级联式培养循环。将靶基因的 mRNA 表达水平标准化至 GAPDH mRNA 水平和利用 SDS 2.0 软件 (Applied Biosystems) 分析数据以计算相对 RNA 量。使用 Prism 进行曲线拟合。

[0270] 就 GeneCard 分析而言,依照制造商指令使用 96 孔 TaqMan 基因卡片阵列。基因卡片检测是在 ABI 7900HT 即时 PCR 系统 (Applied Biosystems) 上运行并利用 $\Delta\Delta Ct$ 方法分析。

[0271] 当比较利用 GeneCard 分析的 HN30 肿瘤和正常人口咽组织之间基因表达模式时,包括 Wnt3、7A、10A 和 11 的 Wnt 配体实质上在 HN30 肿瘤中过度表达而已知的例如 SFRP2、FRZB、SFRP4 和 DKK2 的 Wnt 抑制基因实质上下调,这与 Wnt 信号传导为致病靶的假设一致。该数据指示如果发现 SFRP2、FRZB、SFRP4 或 DKK2 基因表达相较于对照组差异性下调,则细胞系、癌症样本或患者更有可能罹患对 Wnt 抑制剂敏感的癌症类型。具有相较于对照组差异性下调的 SFRP2、FRZB、SFRP4 或 DKK2 基因表达的癌症样本或癌症相比展现可与对照组相当的基因表达的癌症样本或癌症更有可能对 Wnt 抑制剂敏感。该见解可应用于患者分级方法,其中选择将最有可能响应于 Wnt 抑制剂的治疗的患者并进行治疗。

[0272] 针对 40 种 HNSCC 细胞系 (25 种响应性细胞系和 15 种非响应性细胞系) 进行外显子测序,以进一步理解响应化合物 A 治疗的细胞 (包括 HN30 细胞) 的作用机制。TP53、CDKN2A、Notch1/2/3、PTEN、HRAS 和 PIK3CA 属于在该组细胞系中突变的前几种致癌基因或肿瘤抑制基因 (图 11)。

[0273] 全外显子组捕获库制备和测序:使用 Roche NimbleGen V2 (44.1Mbp) 外显子组富集试剂盒 (Otogenetics) 进行外显子组捕获库建构。在具有 $50\times$ 平均覆盖的 Illumina 基因组分析仪 HiX 平台 (Otogenetics) 上进行所捕获外显子的配对末端测序 ($2\times 100\text{bp}$)。

[0274] 序列数据处理:通过布罗德研究所 (Broad Institute) 基因组图谱工具试剂盒 (Genome Atlas Tool Kit) (GATK) 所推荐的标准途径处理测序数据:

[0275] 使用 Burrows-Wheeler 比对器 0.5.9 版 (<http://bio-bwa.sourceforge.net>), 将具有各样本的读取值和品质得分值的原始测序 fastq 文档与 NCBI 人参考基因组 GRCh37 比对。对于各个样本,产生具有其与参考基因组的比对的单一分选二进制比对图谱 (Binary Alignment Map) (BAM) 文档。

[0276] 利用“与已知的插入缺失 (indel) 的样本水平再比对和再校准 (sample level realignment with known indels and recalibration)”方法,进一步清晰化来自比对的 BAM 文档。(<http://www.broadinstitute.org/gatk/guide>)

[0277] GATK 统一基因型用于各次再校准和清晰化 BAM 文档以产生 SNP、多核苷酸多态性 (MNP) 和插入缺失。在各样本的变异调用之后,将其归并为多样本 SNP 和插入缺失调用。基于 SNP 和插入缺失调用形成独立的变异调用格式 (Variant Call Format) (VCF) 文档。

[0278] 接着依 SnpEff (v2.1b <http://snpeff.sourceforge.net/>) 处理所有变异调用以预测其对对应蛋白质产物的功能性影响,和通过 GATK 变异标注器达成其他标注。包括 dbSNP v. 135、COSMIC v. 58、和 ESP5400 的各种公开可取得的数据库用于图谱分析对已知变

异的基因组改变。

[0279] 变异的分析：为减少测序异常，利用各种过滤，包括变异品质 <30，图谱分析品质 <30，变异置信度 <2，和标准化 Phred 规模的概率 >80。相较于参考外显子组，总计有 18349 个基因出现基因组改变。所有 40 种 HNSCC 细胞系中基因组改变的总数为约 169k。然而，其中大多数 (89%) 为标注于上述公开数据库中的已知变异。在这些新颖变异当中，约一半 (总数的 6%) 的变异导致蛋白质序列改变，例如突变、截短、插入和缺失。请注意所有的测序是基于其中不可取得匹配的正常的细胞系而言的。因此，本文所述的某些新颖变异潜在性地可为 SNP。在细胞系传代期间获得的突变也有可能和无法与那些在癌症形成和进展期间获得的区分开来。UM-SCC 系各自具有独特的基因型且是以通常少于自初代培养的 100 个传代的最低可能传代数使用。

[0280] 依 SnpEff 评估基因组改变的功能性影响。高度影响突变包括框移、剪接位点突变、起始密码子损失、终止密码子获得和终止密码子损失。中等影响突变包括框内插入或缺失和非同义突变。通过无论突变是标注于具有 SNP 对偶基因来源 (SAO) <2 的 dbSNP 或在 ESP5400 进入中而非标注于 COSMIC 中来确定潜在生殖是突变。

[0281] 为研究功能突变损失与化合物 A 药理学功能之间的关联性，我们将所有可能的功能损失 (LoF) 变异聚集为一个类别，这是因为已知基因的 LoF 突变可具有跨度较大的范围的蛋白质序列分布的突变。突变包括高度影响突变，例如终止密码子增加、框移、起始密码子损失和剪接位点突变。我们也要求野生型和突变对偶基因的组合序列深度为至少 5，以移除极低覆盖变异。我们使用来自经测序的 40 种 HNSCC 细胞系的变异调用，评估 LoF 变异对各基因的化合物 A PD 响应的富集效应。富集因子是经定义为以下 (即，让步比)，

[0282]
$$E(\text{LoF}) = (P(\text{响应性} | \text{突变}) [1 - P(\text{响应性})]) / (P(\text{响应性}) [1 - P(\text{响应性} | \text{突变})])$$

[0283] 其中 $P(\text{响应性} | \text{突变})$ 表示出现 LoF 突变的基因响应化合物 A 治疗的机率，和 $P(\text{响应性})$ 表示偶然响应化合物 A 治疗的机率。

[0284] 实施例 6 :Notch1 为用于 Wnt 抑制剂的的治疗的最具预测性的生物标记物

[0285] 基于 $E > 2$ 和 LoF 出现次数大于 3 来选择候选基因。在前几种候选基因当中，Notch1LoF 具有最高富集因子中的一种，超过随机选择 3 倍富集。通过测序癌细胞系的 cDNA 或基因组 DNA (GeneWiz) 来确认 Notch1 突变 / 变异。使用序列器 (Sequencher) (GeneCodes) 分析序列。

[0286] 由该数据可得出的结论是与基因突变状态和响应化合物 A 的细胞系路径抑制关联的最为显著的特征是响应性细胞系中的 Notch1 功能损失 (LoF) 突变。

[0287] 如图 13A 和 13B 所显示，已在响应性细胞系当中识别出五种框移 / 无义突变，其中仅一种 Notch1 无义突变属于非响应性细胞系。有趣的是，具有 Notch1 突变的所有细胞出现至少一种会影响 Notch1 的 N 端的突变对偶基因。这点与 Notch1 的 N 端是其功能所需的看法一致，其中 N 端 EGF 重复造成配体 - 受体相互作用¹⁷，使得该区域中的突变更有可能成为 LoF 突变。为进一步表征在 HN30 细胞中识别出的错义突变 (例如 Notch1C478F) 的功能性结果，通过野生型或 C478F 突变体的过度表达进行 Notch 报告基因检测 (图 13C)。C478F 突变位于 Notch1 的胞外域中，据推测这点是 Notch 受体和配体相互作用的关键所在。实际上，在 Notch 配体 DLL1 的存在下，突变体 C478F Notch1 的活性在该 Notch 报告基因检测中

消失（图 13C）。

[0288] 这均可在支持例如化合物 A 的 PORCN 抑制剂的临床治疗中提供指导给患者选择。

[0289] 在 HNSCC 细胞系 SNU1076 中识别出 DTX3L (Deltex 3 样, 也称为 BBAP, B- 淋巴瘤 - 和 BAL- 相关蛋白) 杂合子无义突变。DTX3L 为 E3 泛素连接酶。其在哺乳动物 Notch 路径中的细胞功能尚不明确, 但其果蝇同系物 Deltex 为果蝇中的 Notch 信号传导的正调节物。在小鼠 SNU1076 异种移植模型中, 化合物 A 在 5mg/kg 的剂量下在治疗 14 天后可明显地抑制肿瘤生长 (T/C : 25%) (图 14A)。除此之外, 化合物 A 实质上抑制 Wnt 路径, 这点由 AXIN2 减少 70% 指示 (图 14B)。DTX3L 的损失可提供一种使 Notch 信号传导路径失活并随后活化 Wnt 信号传导的替代机制。

[0290] 实施例 7 : 作为 Wnt 抑制剂治疗的预测性标记物的 HRAS 和 FAT1。

[0291] 由本发明外显子组测序和细胞系特征分析, 我们可观察到化合物 A 响应者的富集在 FAT1 突变体头颈部癌细胞系中 (图 15)。此外, 由本发明分析可知, 出现 HRAS 突变的 5 种细胞系中有 4 种对化合物 A 响应 (图 16)。

[0292] 实施例 8 : 由基因组数据和临床涵义预测细胞系对 Wnt 抑制剂的化学敏感性。

[0293] 如由外显子组测序所确定, Notch1 基因表达 (例如, 突变状态) 是 Wnt 抑制剂敏感性的最有力指示之一, 且因此可用作被视为是用于选择响应例如化合物 A 的 Wnt 抑制剂的癌症患者的分级生物标记物。癌症相关细胞系的板中 Notch1LoF 突变与 Wnt 抑制剂的化学敏感性的关联性证实 Notch1 在预测患者对 Wnt 抑制剂敏感性上是有价值的。Notch1LoF 突变是用于基于 40 种头颈癌细胞系 (如上所述) 的生物信息分析来预测路径抑制响应。除 Notch1 外并基于肿瘤模型, SFRP2、FRZB、SFRP4 和 DKK2 也与 Wnt 抑制剂的效力相关联。在选自本文所述者的至少两种生物标记物的组用于预测敏感性的情况下, 预期甚至更优选的预测能力。借助于生物信息分析, 识别出可用于患者分级的另一组有用的生物标记物 : FAM58A、FLJ43860、NOTCH1、CDKN2A、OR7G3、CCDC168、ZNF527、HRAS 和 FAT1。因为 HNSCC 患者中 Notch1LoF 突变的发生率相对较高, 故 Notch1 基因表达尤其适于选择 HNSCC 患者。癌细胞系的板中 NOTCH1LoF 突变与 Wnt 抑制剂的化学敏感性的关联性证实 NOTCH1 具有超过随机选择 3 倍富集的预测值。其他上述生物标记物也与对 Wnt 抑制剂敏感的临床前模型相关联。作为临床场景的推断, 基于上述生物标记物的患者选择将增加 Wnt 抑制剂治疗时临床响应的可能性。

[0294] 参考文献

[0295] 1 Polakis, P. Wnt signaling in cancer. Cold Spring Harbor perspectives in biology 4, doi:10.1101/cshperspect.a008052 (2012)。

[0296] 2 Nusse, R. & Varmus, H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. The EMBO journal 31, 2670-2684, doi:10.1038/emboj.2012.146 (2012)。

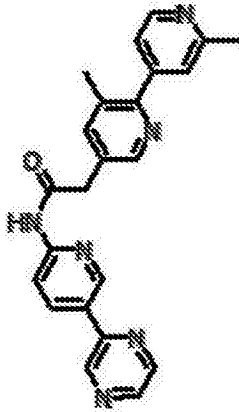
[0297] 3 Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. Cell 149, 1192-1205, doi:10.1016/j.cell.2012.05.012 (2012)。

[0298] 4 Seshagiri, S. 等人 Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. Nature 488, 660-664, doi:10.1038/nature11282 (2012)。

[0299] 5 Hao, H. X. 等人 ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an

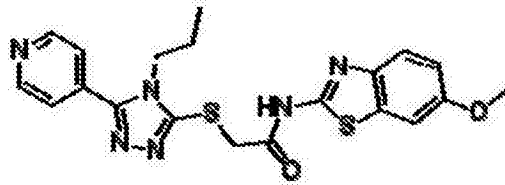
- R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485, 195–200, doi:10.1038/nature11019 (2012)。
- [0300] 6 Koo, B. K. 等人 Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488, 665–669, doi:10.1038/nature11308 (2012)。
- [0301] 7 Grigoryan, T. , Wend, P. , Klaus, A. & Birchmeier, W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes & development* 22, 2308–2341, doi:10.1101/gad.1686208 (2008)。
- [0302] 8 Aoki, K. & Taketo, M. M. Tissue-specific transgenic, conditional knockout and knock-in mice of genes in the canonical Wnt signaling pathway. *Methods Mol Biol* 468, 307–331, doi:10.1007/978-1-59745-249-6_24 (2008)。
- [0303] 9 Wang, Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics* 8, 2103–2109, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0282 (2009)。
- [0304] 10 Herr, P. , Hausmann, G. & Basler, K. WNT secretion and signalling in human disease. *Trends in molecular medicine* 18, 483–493, doi:10.1016/j.molmed.2012.06.008 (2012)。
- [0305] 11 Takada, R. 等人 Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental cell* 11, 791–801, doi:10.1016/j.devcel.2006.10.003 (2006)。
- [0306] 12 Biechele, S. , Cox, B. J. & Rossant, J. Porcupine homolog is required for canonical Wnt signaling and gastrulation in mouse embryos. *Developmental biology* 355, 275–285, doi:10.1016/j.ydbio.2011.04.029 (2011)。
- [0307] 13 Barrott, J. J. , Cash, G. M. , Smith, A. P. , Barrow, J. R. & Murtaugh, L. C. Deletion of mouse Porcn blocks Wnt ligand secretion and reveals an ectodermal etiology of human focal dermal hypoplasia/Goltz syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12752–12757, doi:10.1073/pnas.1006437108 (2011)。
- [0308] 14 Wang, X. 等人 Mutations in X-linked PORCN, a putative regulator of Wnt signaling, cause focal dermal hypoplasia. *Nature genetics* 39, 836–838, doi:10.1038/ng2057 (2007)。
- [0309] 15 Grzeschik, K. H. 等人 Deficiency of PORCN, a regulator of Wnt signaling, is associated with focal dermal hypoplasia. *Nature genetics* 39, 833–835, doi:10.1038/ng2052 (2007)。
- [0310] 16 Leemans, C. , Braakhuis, B. , Brakenhoff, R. , The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 11(1), 9–22, doi:10.1038/nrc.2010.12.16 (2011)。
- [0311] 17 Kopan R (2012) Notch signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(10)。

1A



化合物 A

1B



化合物 B

图 1

图 2A

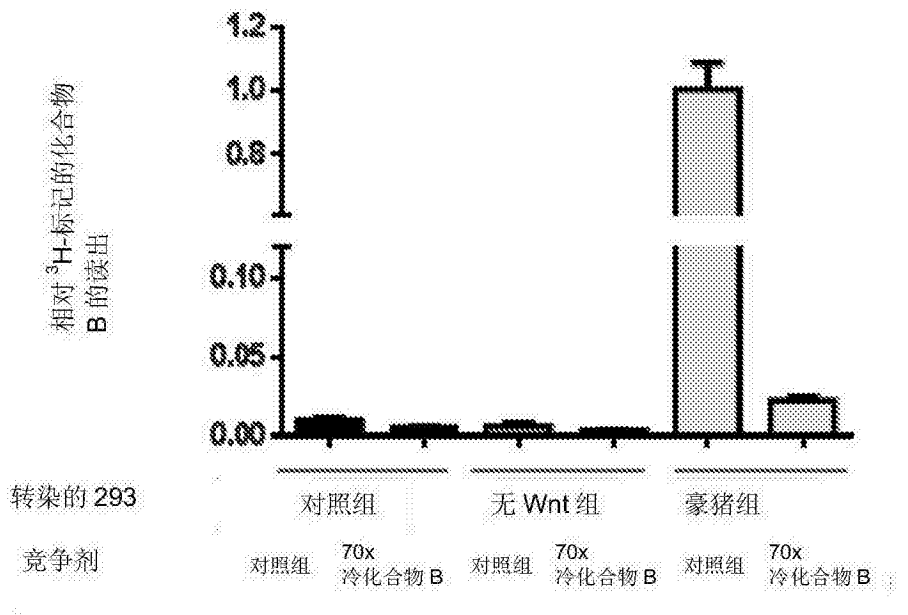


图 2B

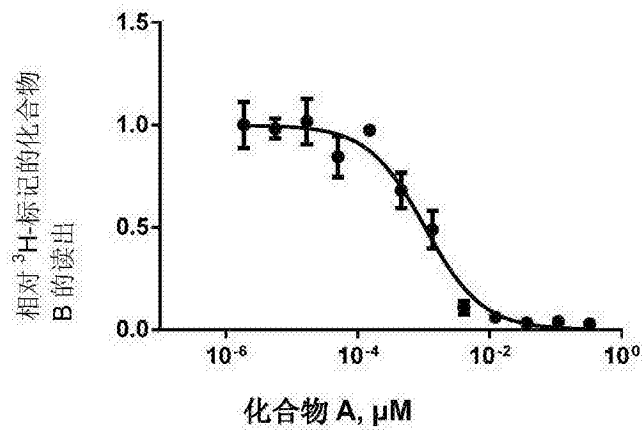


图 2

图 3A

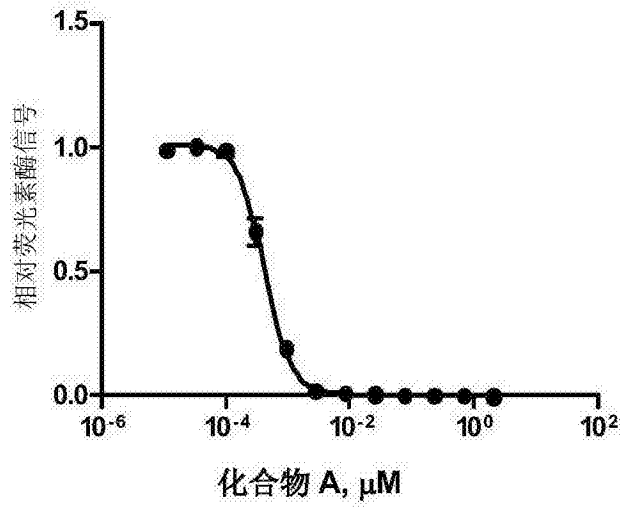


图 3B

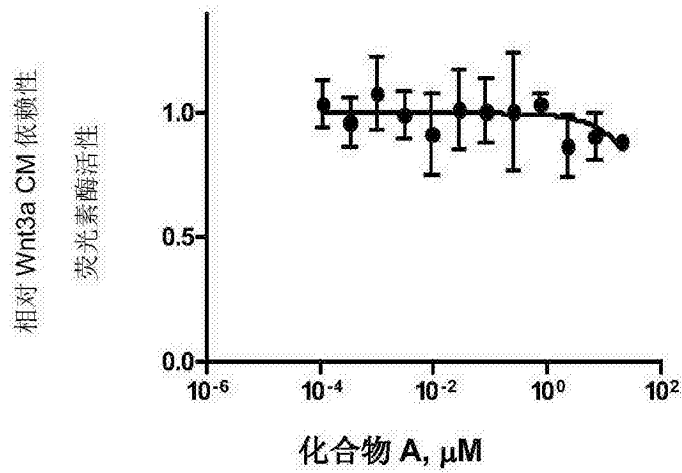


图 3

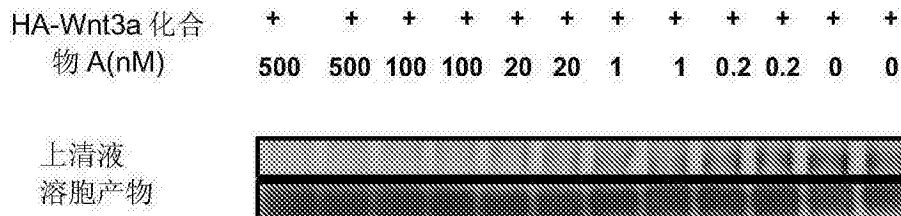


图 4

图 5A

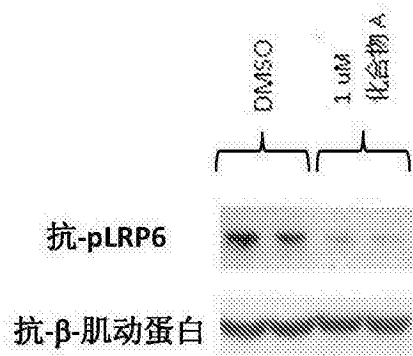


图 5B

WN10A_H	CHGTSGSCQLKTCW
WN10B_H	CHGTSGSCQFKTCW
WNT6_HU	CHGLSGSCALRTCW
WNT3_HU	CHGLSGSCEVKTCW
WNT3A_H	CHGLSGSCEVKTCW
WNT1_HU	CHGMSGSCTVRTCW
WNT4_HU	CHGVSGSCEVKTCW
WNT7A_H	CHGVSGSCTTKTCW
WNT7B_H	CHGVSGSCTTKTCW
WNT16_H	CHGVSGSCAVKTCW
WNT2_HU	CHGVSGSCTLRTCW
WNT2B_H	CHGVSGSCTLRTCW
WNT5A_H	CHGVSGSCSLKTCW
WNT5B_H	CHGVSGSCSLKTCW
WNT8A_H	CHGTSGSCSIQTCW
WNT8B_H	CHGVSGSCTTQTCW
WNT11_H	CHGVSGSCSIRTCW
WNT9A_H	CHGVSGSCTVRTCW
WNT9B_H	CHGVSGSCAVRTCW
	*** **

图 5C

试验	化合物 A IC ₅₀ (nM)
Wnt1 (RGA)	1.1
Wnt2 (RGA)	0.2
Wnt3 (RGA)	0.6
Wnt3a (RGA)	0.9
Wnt6 (RGA)	0.2
Wnt7a (RGA)	2.4
Wnt9a (RGA)	0.05

图 5

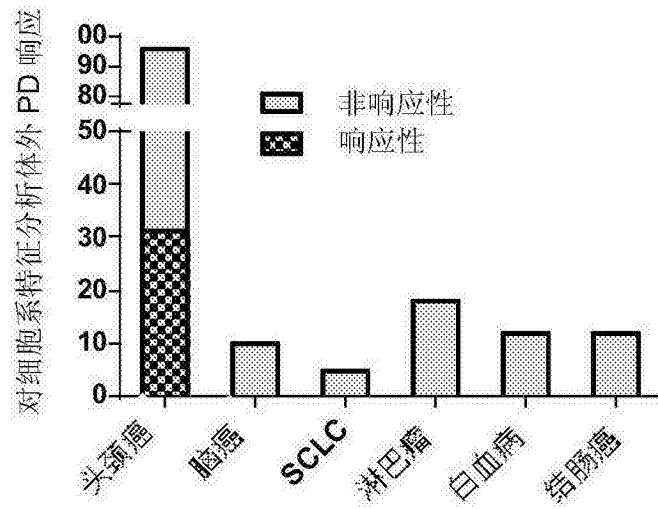


图 6

编号	头颈癌细胞系名称	Axin2 响应降低	Axin2 抑制 (1-治疗组/对照组)	编号	头颈癌细胞系名称	Axin2 响应降低	Axin2 抑制 (1-治疗组/对照组)
1	A-253	否	0	21	UMSCC 10A	是	0.5
2	CAL27	是	0.7	22	UMSCC 10B	否	0.3
3	Detroit 562	否	0.2	23	UMSCC 11A	是	0.6
4	FaDu	否	0	24	UMSCC 11B	是	0.6
5	HN30	是	0.9	25	UMSCC 12	否	0.4
6	Hs 840.T	否	0	26	UMSCC 13	是	0.9
7	SCC-4	否	0.4	27	UMSCC 14A	否	0.0
8	SCC-9	否	0	28	UMSCC 14B	是	0.5
9	SCC-25	否	0.1	29	UMSCC 14C	是	0.7
10	SNU-1066	否	0.3	30	UMSCC 16	否	0.3
11	SNU-1076	是	0.9	31	UMSCC 17A	否	0.3
12	UMSCC 1	是	0.9	32	UMSCC 17B	是	0.6
13	UMSCC 2	否	0.2	33	UMSCC 19	是	0.5
14	UMSCC 3	否	0.0	34	UMSCC 21A	否	0.1
15	UMSCC 4	否	0.3	35	UMSCC 22A	否	0.3
16	UMSCC 5	否	0.3	36	UMSCC 22B	否	0.0
17	UMSCC 6	是	0.9	37	UMSCC 23	否	0.3
18	UMSCC 7	否	0.4	38	UMSCC 25	是	0.9
19	UMSCC 8	否	0.4	39	UMSCC 26	否	0.3
20	UMSCC 9	是	0.8	40	UMSCC 28	是	0.7

图 7

编号	头颈癌细胞系名称	Axin2 响应降低	Axin2 抑制 (1-治疗组/对照组)	编号	头颈癌细胞系名称	Axin2 响应降低	Axin2 抑制 (1-治疗组/对照组)
41	UMSCC 29	是	0.7	63	UMSCC 53	否	0.1
42	UMSCC 30	否	0.3	64	UMSCC 55	否	0.0
43	UMSCC 31	否	0	65	UMSCC 58	否	0.4
44	UMSCC 33	否	0.2	66	UMSCC 59	是	0.7
45	UMSCC 34	是	0.9	67	UMSCC 60	否	0.2
46	UMSCC 35	是	0.6	68	UMSCC 62	否	0.3
47	UMSCC 36	否	0.0	69	UMSCC 63	是	0.8
48	UMSCC 37	否	0.0	70	UMSCC 67	否	0.2
49	UMSCC 38	是	0.5	71	UMSCC 69	否	0.4
50	UMSCC 39	否	0.0	72	UMSCC 70	否	0.3
51	UMSCC 40	否	0.3	73	UMSCC 71	否	0.2
52	UMSCC 41	是	0.6	74	UMSCC 73B	否	0.4
53	UMSCC 42	否	0.3	75	UMSCC 74A	否	0.0
54	UMSCC 43	是	0.7	76	UMSCC 74B	否	0.0
55	UMSCC 44	否	0.0	77	UMSCC 76	是	0.7
56	UMSCC 45	是	0.5	78	UMSCC 77	否	0.2
57	UMSCC 46	是	0.5	79	UMSCC 78	否	0.0
58	UMSCC 47	否	0.3	80	UMSCC 80	否	0.0
59	UMSCC 49	否	0.2	81	UMSCC 81A	否	0.0
60	UMSCC 50	否	0.1	82	UMSCC 81B	否	0.3
61	UMSCC 51	否	0.4	83	UMSCC 83A	否	0.2
62	UMSCC 52	否	0.2	84	UMSCC 83B	否	0.4

图 7 续表

编号	头颈癌细胞系名称	Axin2 响应降低	Axin2 抑制 (1-治疗组/对照组)	编号	头颈癌细胞系名称	Axin2 响应降低	Axin2 抑制 (1-治疗组/对照组)
85	UMSCC 85	否	0.0	91	UMSCC 98	否	0.1
86	UMSCC 90	是	0.5	92	UMSCC 103	否	0.0
87	UMSCC 92	是	0.9	93	UMSCC 104	否	0.0
88	UMSCC 93	是	0.6	94	UMSCC 105	否	0.3
89	UMSCC 94	否	0.3	95	UMSCV 1A	否	0.0
90	UMSCC 97	是	0.8	96	UMSCV 6	否	0.1

图 7 续表

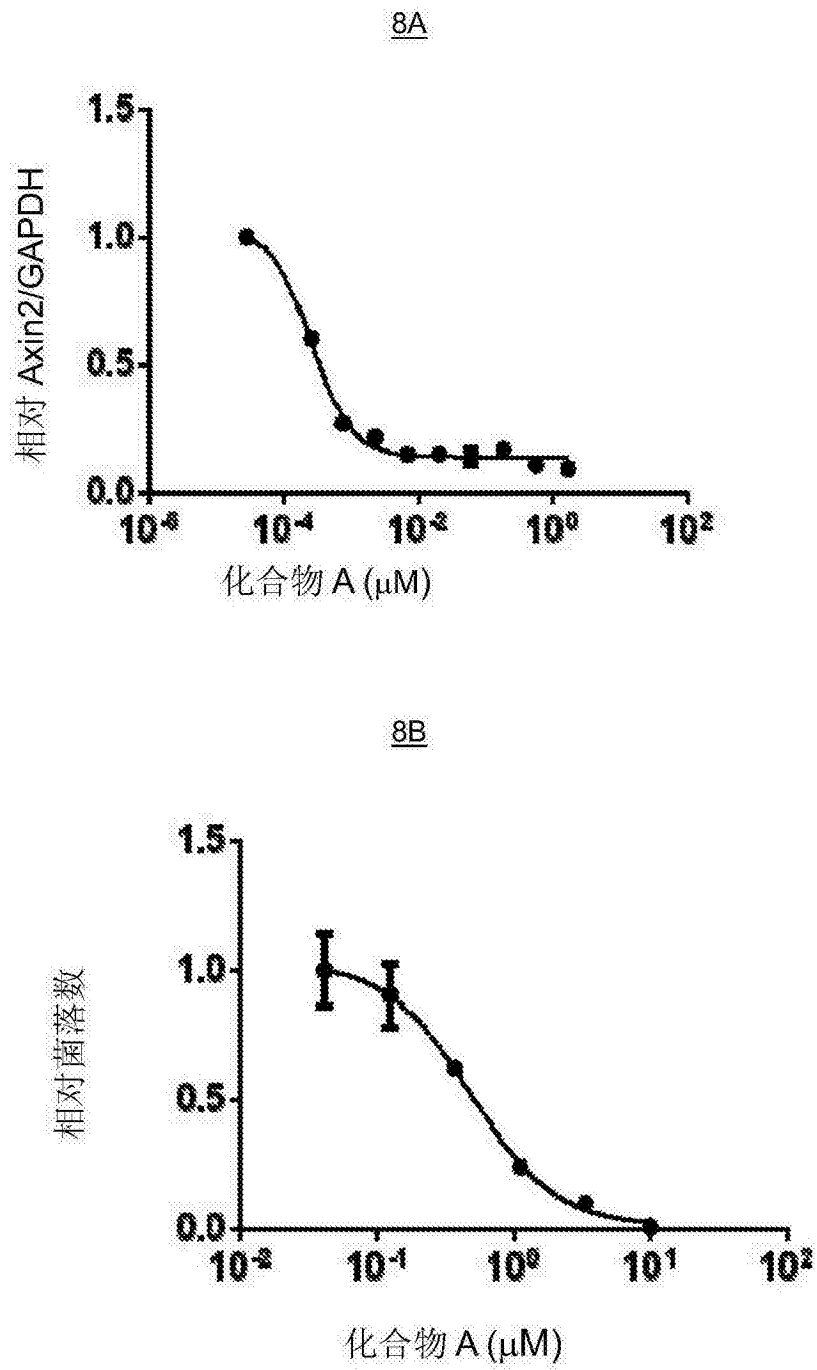
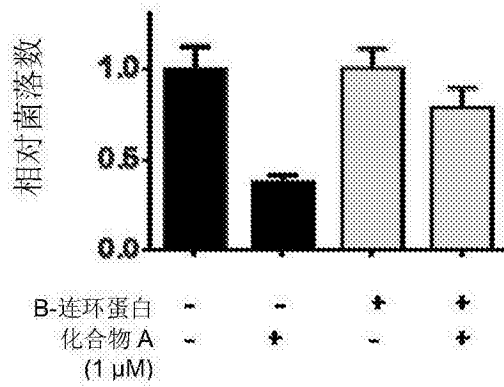
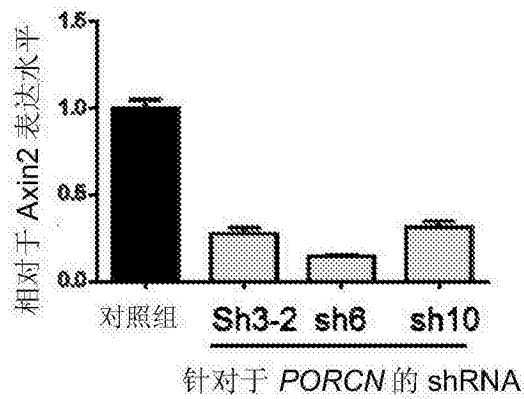


图 8

9A



9B



9C

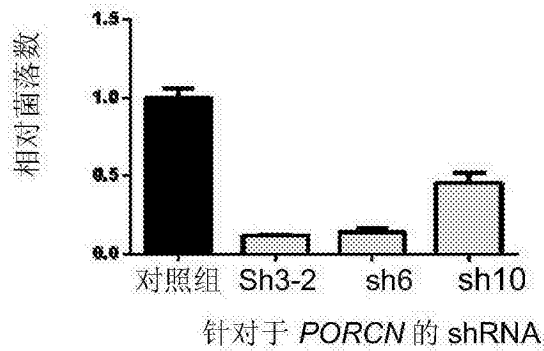


图 9

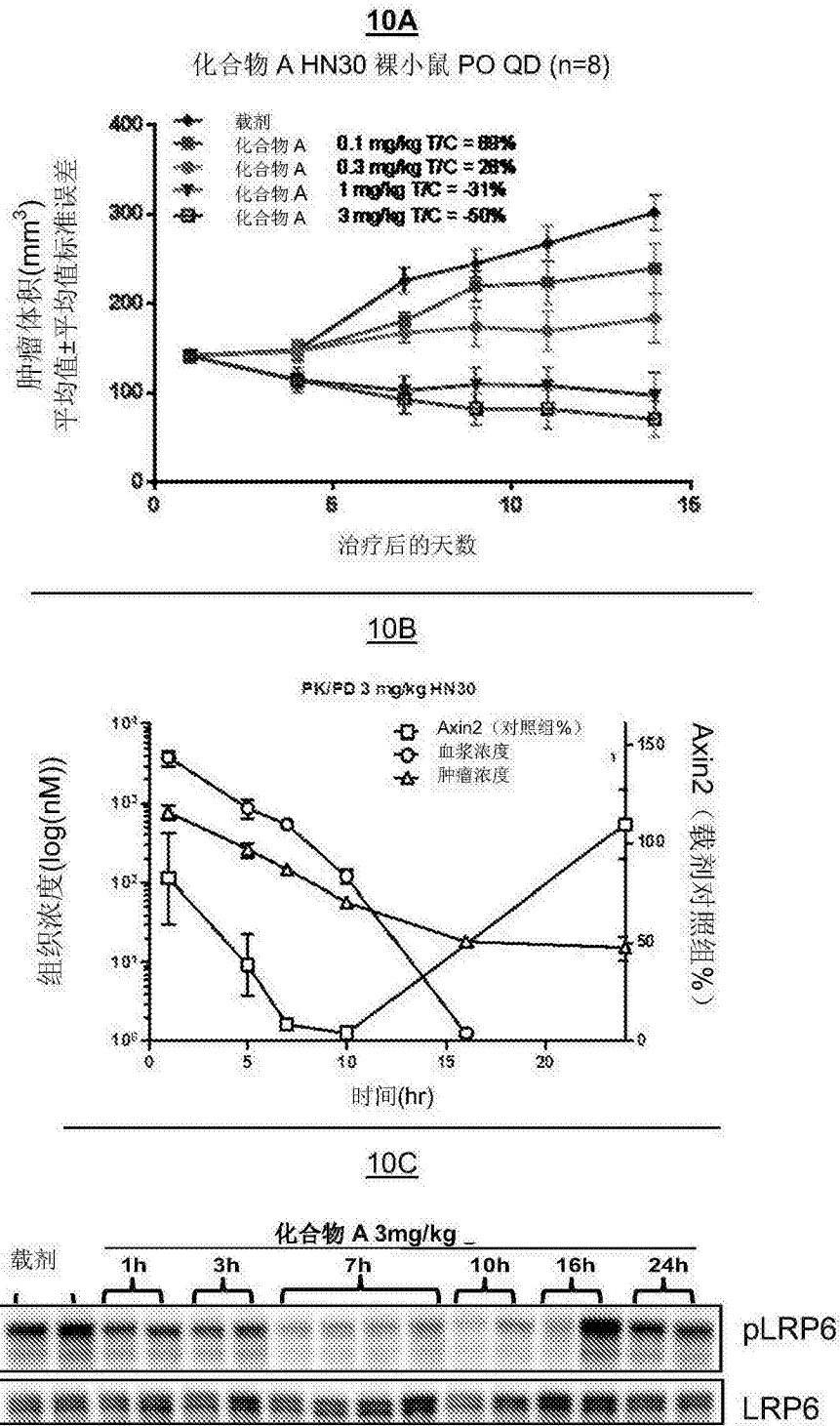


图 10

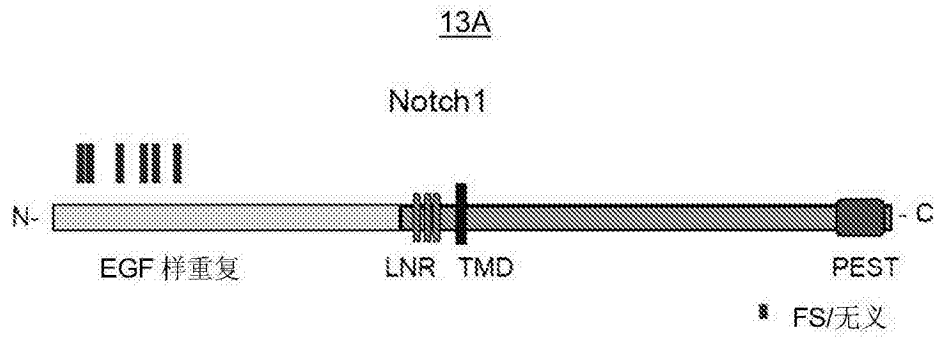
<u>基因</u>	<u>突变发生率</u>
<u>TP53</u>	<u>27/40 (68%)</u>
<u>CDKN2A</u>	<u>7/40 (18%)</u>
<u>Notch1</u>	<u>10/40 (25%)</u>
<u>PTEN</u>	<u>1/40 (3%)</u>
<u>HRAS</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>PIK3CA</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>Notch2</u>	<u>5/40 (13%)</u>
<u>Notch3</u>	<u>2/40 (5%)</u>

图 11

基因	基因组改变	氨基酸改变	响应性突变体	抗性突变体	富集因子
FAM58A	g.chrX:152864477G>GC g.chrX:152858079GC>G g.chrX:152864513G>GC	A18fs, A181fs, A6fs	11	1	6.6
FLJ43860	g.chr8:142459777C>CA	L850fs	7	1	4.2
NOTCH1	g.chr9:139411813AC>A g.chr9:139411793TG>T g.chr9:139410488C>CT g.chr9:139417470C>A g.chr9:139412259CTGGCACGG>C g.chr9:139417398C>A	E488fs, G192X, E216X, K538fs, A495fs, P460fs,	5	1	3.0
OR7G3	g.chr19:9236916AG>A	A237fs	8	2	2.4
CCDC168	g.chr13:103386417C>A g.chr13:103384147C>T	E5544X, W6300X	4	1	2.4
ZNF527	g.chr19:37879852C>CTGTG g.chr19:37879854AT>A	P301fs, Y302fs	7	2	2.1
CDKN2A	g.chr9:21971123TGA>T g.chr9:21968242C>T g.chr9:21971186G>A g.chr9:21971028C>T g.chr9:21971120G>A	S78fs, W110X, R58X, R80X	4	0	NA

fs: 框移; X: 无义突变

图 12



13B

细胞系	对化合物 A 响应	Notch1 突变
UMSCC 25	是	E488fs
UMSCC 28	是	A495fs
UMSCC 29	是	K538fs
UMSCC 47	否	G192X
UMSCC 59	是	P460fs
UMSCC 76	是	E216X

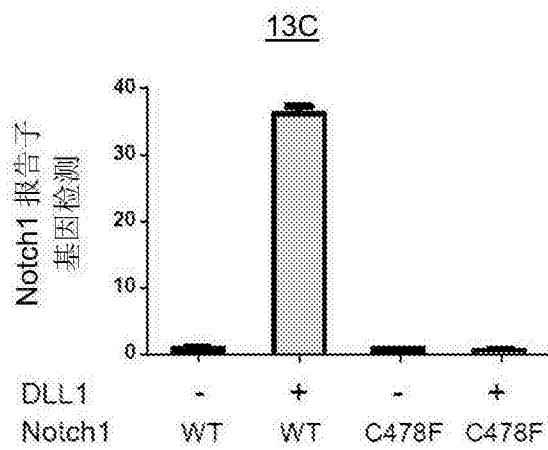
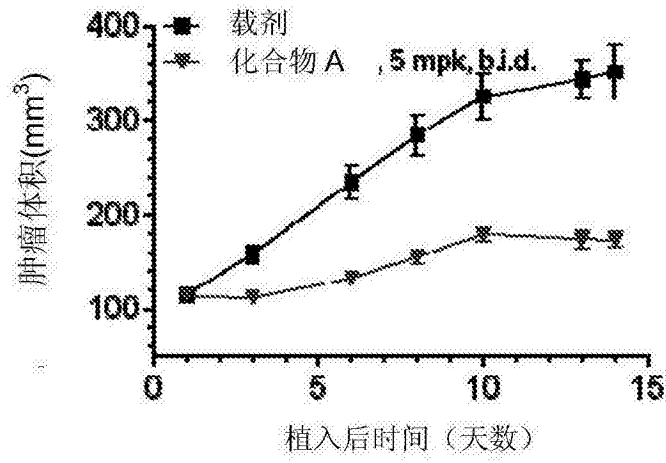


图 13

14A



14B

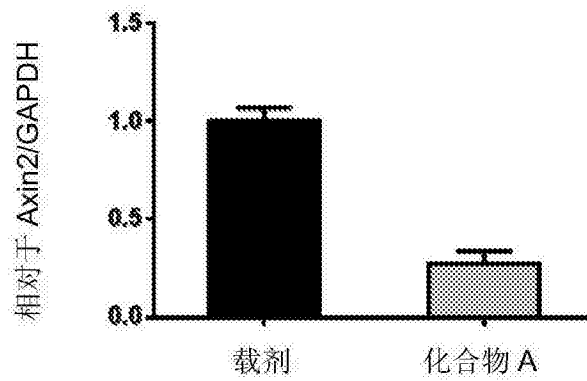


图 14

细胞系	对化合物 A 响应	FAT1 突变
UMSCC 63	是	P2559S
UMSCC 11A	是	D4109G
UMSCC 41	是	G4147C
UMSCC 35	是	P2559L
UMSCC-25	是	N524fs
UMSCC-43	是	M1150fs
UMSCC 8	否	Q3887X

图 15

细胞系	对化合物 A 响应	HRAS 突变
UMSCC 17B	是	Q61L
UMSCC 43	是	G12V
UMSCC 63	是	G13D
UMSCC 17A	否	Q61L
HN30	是	G12D

图 16