

TÍTULO DEL PROYECTO: NUEVO TRATAMIENTO DIRIGIDO Y PERSONALIZADO DE NEUROBLASTOMAS DE ALTO RIESGO

CENTRO DE EJECUCIÓN: INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE

Laboratorio de Investigación Clínica y Traslacional en Cáncer

INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma es, después de los accidentes domésticos, la segunda causa más frecuente de mortalidad en niños y es el cáncer más frecuente en niños menores de cinco años de edad. Cerca de 900 nuevos casos se diagnostican cada año en la Unión Europea (EU27) y unos 700 casos en Estados Unidos. A pesar de los avances en la terapia multimodal para el neuroblastoma, los neuroblastomas con amplificación del gen *MYCN* (1), con delección de la región cromosómica 11q o en 1p siguen teniendo muy mal pronóstico (2). Por tanto, el encontrar dianas terapéuticas eficaces para cualquiera de estas tres alteraciones genéticas sigue siendo prioritario en la lucha contra esta enfermedad. Este proyecto de investigación es relevante para niños con neuroblastoma con *MYCN* amplificado y tiene por objetivo el proporcionar la prueba de concepto para su tratamiento con una terapia dirigida que se utiliza actualmente en adultos con leucemia mielóide aguda (LMA). Se trata pues de un proyecto de investigación traslacional que está basado en mecanismos moleculares similares y en estudios *in silico* que apoyan este estudio.

MYCN se localiza en la región distal del brazo corto del cromosoma 2 (2p24). En células con amplificación, las copias extras de *MYCN* se acumulan por un mecanismo extracromosómico o regiones teñidas homogéneamente dando lugar a lo que se conoce como *dobles minutos* (3). Aunque genes adicionales pueden co-amplificarse junto con *MYCN* (*DDX1*, *NAG*, y *ALK*; (4)), *MYCN* es el único gen que consistentemente se amplifica en este locus. La amplificación genómica de *MYCN* se ha descrito como una alteración cromosómica muy frecuente en neuroblastomas (25%), correlacionándose inversamente con la delección alélica en 11q23 (5-7). En un estudio posterior, utilizando la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), se encontró que las alteraciones cromosómicas en 11q junto con 3p, 1p y la amplificación de *MYCN*, permiten clasificar a los neuroblastomas en subgrupos diferentes (8). La expresión ectópica (mediante la transfección del gen) en células embrionarias de rata es la causante de su transformación oncogénica y la amplificación de *MYCN* da lugar a su sobreexpresión y consecuentemente a su ganancia de su función (9, 10). En niños, la amplificación de *MYCN* provoca frecuentemente su rápida recaída y evolución fatal, por lo que la amplificación de *MYCN* es de por sí un factor de mal pronóstico y los neuroblastomas que contienen esta alteración son clasificados como de alto riesgo (11, 12). Estos neuroblastomas necesitan de una terapia más agresiva con objeto de frenar la enfermedad. Se ha observado que el tratamiento con interferón gamma potencia los

efectos del ácido retinoico aumentando la diferenciación de las células del sistema simpático (13). Nosotros hemos publicado recientemente que el inhibidor del proteasoma Bortezomib también es un importante potenciador del ácido retinoico, aumentando la diferenciación y la apoptosis de las células madre cancerosas, por lo que este doble tratamiento pudiera inhibir o retrasar la recaída (14). Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido un fármaco específicamente dirigido contra *MYCN*. El entender cómo la sobreexpresión de *MYCN* provoca la transformación de una célula normal en cancerosa pudiera identificar nuevas dianas moleculares en las que dirigir una terapia más eficaz para este tipo de neuroblastomas.

En la célula, la proteína *MYCN* actúa como un factor de transcripción perteneciente a la familia *MYC* de proto-oncogenes y está implicada en una gran variedad de procesos celulares incluyendo proliferación, crecimiento, apoptosis, metabolismo y diferenciación (15). La expresión de *MYCN* ocurre preferencialmente durante el desarrollo embrionario y se restringe a áreas del cerebro, células B precursoras, riñón e intestino, a diferencia de *MYC*, otro miembro de la familia cuya expresión es ubicua y se mantiene también durante la etapa del adulto, (16). Sin embargo, *MYCN* es funcionalmente muy similar a *cMYC*, pudiendo reemplazarle y desempeñar todas sus funciones fisiológicas normales (17). Se trata, por tanto, de una distinta distribución de funciones en el tiempo y en el espacio, pero no de una distinta función intrínseca.

Diversos estudios recientes se han centrado en encontrar fármacos dirigidos contra *MYCN* o contra otras proteínas que regulan su función o estabilidad. En su forma activa *MYCN* heterodimeriza con *MAX* y se une a la secuencia CACGTG, llamada caja-E, localizada en la región promotora de diversos genes (18, 19), por lo que una aproximación versó en desestabilizar esa estructura impidiendo dicha interacción. El cribado de fármacos llevó a identificar el compuesto 10058-F4 (Omomyc) cuya eficacia se ha estudiado en ensayos preclínicos con modelos animales (20), pero los resultados no han sido todo lo significativos que se esperaban debido a su baja potencia y no hay ensayos clínicos abiertos con él.

Otros grupos también han cursado su investigación en la identificación de otros cofactores relevantes para *MYCN* con objeto de dirigir nuevas terapias más eficaces. En este sentido, algunos inhibidores de la kinasa *AURKA* causan un cambio de conformación de su dominio catalítico impidiendo la interacción con *MYCN* (21). Algunos inhibidores de *AURKA* ha mostrado su eficacia en estudios preclínicos de neuroblastoma y cáncer de próstata neuroendocrino con *MYCN* amplificado y se está estudiando su pase a fase II (22-24). El estudio de alto rendimiento para identificar otras kinasas que pudieran ser relevantes para *MYCN* ha llevado a sugerir a *CHK1* y a *AURKA* en glioblastomas pediátricos con *MYCN* amplificado (25). El tratamiento con el inhibidor VX-689 de *AURKA* de células con amplificación de *MYCN* redujo los niveles de *MYCN* así como la viabilidad celular de manera dosis dependiente. Igualmente, el inhibidor de *CHK1* CCT244747 mostró actividad antitumoral in vivo en xenografts de neuroblastoma (26).

Hemos encontrado varias evidencias (véase páginas 3 y 4) que sugieren que la amplificación de *MYCN* conlleva la sobreexpresión de la enzima metabólica isocitrato deshidrogenasa (*IDH2*). *IDH2* forma parte del ciclo de Krebs y su mutación es causante de la sobreproducción de un oncometabolito, el 2-hidroxiglutarato (2HG), que interacciona con el factor de hipoxia *HIF1A* estabilizándolo y aumentando la angiogénesis (27). Además, 2HG actúa alostéricamente inhibiendo a las dioxigenasas, enzimas encargadas de desmetilar el DNA y las histonas, resultando en cambios epigenéticos notables en todo el genoma de la célula cancerosa. Recientemente se está probando un inhibidor de *IDH2*, AG-221, en adultos con LMA y está dando unos resultados sin precedentes (28).

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Nuestra **hipótesis de trabajo** es que parte de *la actividad oncogénica de MYCN en neuroblastomas se debe a la transcripción, la sobreexpresión y sobreactivación de IDH2*. Por lo tanto, la inhibición de la formación del complejo transcripcionalmente activo de *MYCN* o de la actividad de *IDH2* en neuroblastomas con *MYCN* amplificado puede resultar en una terapia más eficaz y mucho más dirigida en estos neuroblastomas de alto riesgo.

Con todo ello, **el objetivo fundamental** de este proyecto de investigación es probar *in vitro* (con cultivos celulares) e *in vivo*, con modelos animales, la eficacia del inhibidor AG-221 en neuroblastomas con *MYCN* amplificado y encontrar un fármaco que inhiba la activación de *MYCN*.

EVIDENCIAS

A) Hay tres evidencias indirectas que apoyan el que este fármaco de adultos también pudiera ser efectivo en neuroblastomas con *MYCN* amplificado:

1.- Estudios recientes han revelado que la sobreexpresión de *MYC* en cánceres de mama coincide también con niveles altos de expresión de 2HG (29).

2.- Nuestros estudios *in silico* con diversas cohortes de pacientes con neuroblastoma revelan la correlación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de *MYCN* y la sobreexpresión de *IDH2*:

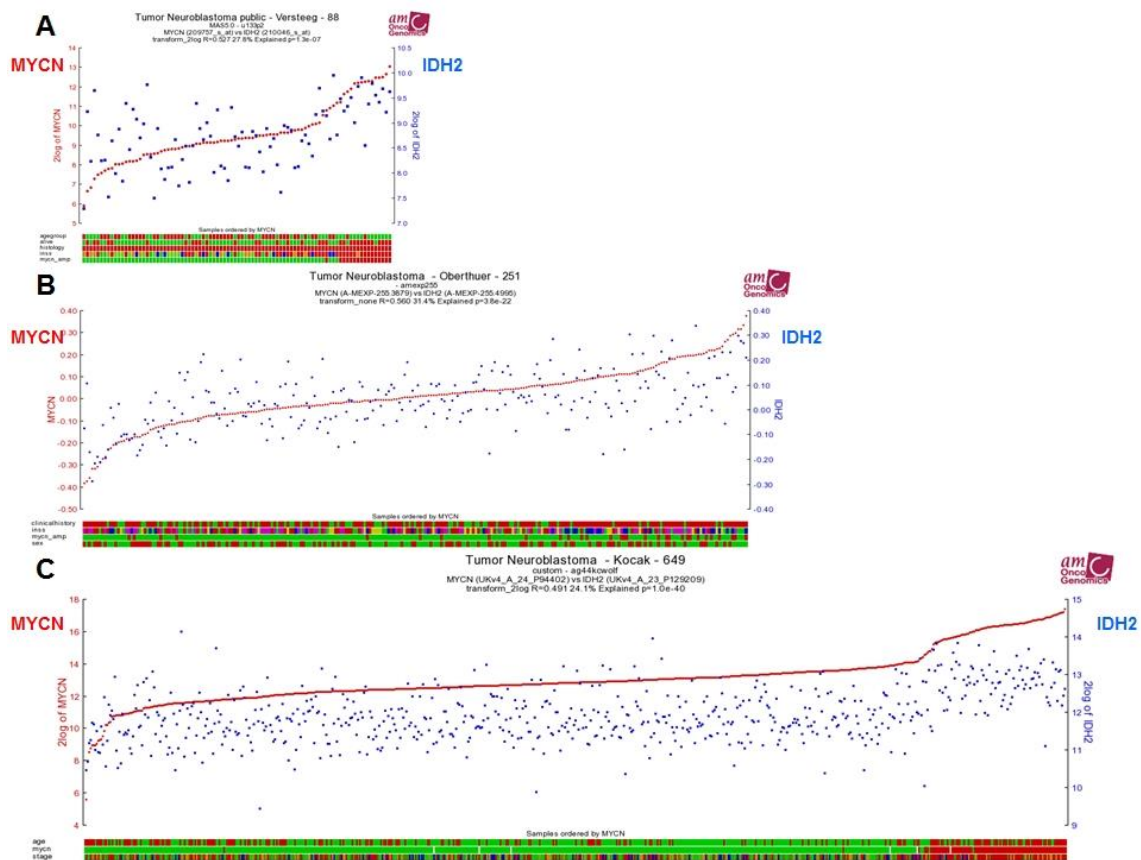


Figura 1. Análisis insílico mostrando la correlación de los niveles de expresión de *MYCN* y de *IDH2* en tres estudios independientes de neuroblastoma: **(A)** en una cohorte de 88 pacientes, $R=0.52$, $p=1.3 \times 10^{-7}$; **(B)** en una cohorte de 256 pacientes, $R=0.56$, $p=3.8 \times 10^{-22}$; **(C)** en una cohorte de 649 pacientes, $R=0.49$, $p=1.0 \times 10^{-40}$.

3.- Los neuroblastomas con *MYCN* amplificado tienen importantes cambios epigenéticos, sugiriendo la sobreactivación oncológica de *IDH2*. Por un lado, la amplificación de *MYCN* se correlaciona con un fenotipo metilador de islas CpG (30). Por otro lado, la acción oncogénica de *MYCN* depende de la proteína arginina metiltransferasa 5 (*PRMT5*) (31) y la sobreexpresión de *MYCN* se correlaciona con la de la desmetilasa *KDM4B* y ambas proteínas interaccionan entre sí para activar la transcripción de genes dependientes de *MYCN* (32). Además, la regulación de los genes transcritos por *MYCN* depende de si la caja-E está metilada o no (33). Con todo ello, nuestra **hipótesis de trabajo inicial** es que todas estas regulaciones epigenéticas tienen como denominador común la sobreactivación de *IDH2* y la producción de 2HG. Por tanto, los neuroblastomas con *MYCN* amplificado pueden ser susceptibles de tratarse con el inhibidor de *IDH2*, AG-221.

B) Los dominios de alfa hélice de las proteínas son las estructuras secundarias más comunes que sirven para el reconocimiento específico de otras proteínas y biomoléculas celulares. La interacción proteína-proteína de MYCN y MAX ocurre a través de dos dominios con estructura de alfa hélice y de esta interacción depende el que la célula se divida y prolifere (34). Por tanto, el diseño racional de pequeñas moléculas sintéticas que mimeticen esta estructura pudiera interrumpir la interacción funcional de MYCN e inhibir la proliferación de las células de neuroblastoma con amplificación de *MYCN*. A este respecto, Hamilton y colaboradores han desarrollado pequeñas moléculas sintéticas que mimetizan la superficie hidrofóbica de las alfa hélices de proteínas (35). Este tipo de estrategias han resultado exitosas en la inhibición de distintas interacciones de proteínas implicadas en cáncer, como Vav, Dbl, Tiam1, el receptor de ácido retinóico RAR α , AIB1 (pCIP), etc. (36).

Nuestra **hipótesis de trabajo inicial** es que un compuesto mimético de dicha interacción puede disrumpirla y bloquear la proliferación de las células de neuroblastoma con *MYCN* amplificado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y METODOLOGÍA

Objetivo 1: Estudio *in vitro* con líneas celulares y cultivos primarios derivados de tumores de pacientes de nuestro hospital de la sensibilidad a AG-221. En la actualidad disponemos de 8 líneas celulares de neuroblastoma, 4 de ellas con *MYCN* amplificado (NGP, NBL-S, IMR-5, SK-N-AS, NLF, SK-N-BE(2), SH-SY5Y, LA-N-1). También hemos generado 4 cultivos primarios procedentes de pacientes con neuroblastoma, 3 de ellos con *MYCN* amplificado (PACA, 840, 901, MOD). Otro inhibidor de *IDH2* disponible comercialmente para laboratorios de investigación es el AGI-6780 (Selleckchem). Cada línea celular se creará en 2 condiciones distintas y cada condición en triplicado: un control tratado solo con sulfóxido de dimetilo (DMSO, disolvente del AGI-6780) y un cultivo tratado con AG-6780 (1, 3 y 10 μ M). También planeamos estudiar el tratamiento combinado con temozolomida (TMZ, 100 μ M), empleado habitualmente en la terapia de neuroblastomas, y sólo con TMZ a la dosis indicada. El grado de proliferación celular se determinará con la reacción colorimétrica XTT (Roche) durante 3-5 días, tiempo variable que dependerá según el grado de tolerancia de cada línea celular a las condiciones del tratamiento. De las tres concentraciones de AGI-6780 estudiadas, los resultados más significativos se emplearán para realizar los estudios de apoptosis.

Adicionalmente al estudio de proliferación nos proponemos estudiar el efecto de AGI-6780 sobre la muerte celular controlada o apoptosis. En ocasiones el problema de los cánceres no es completamente el que las células proliferen excesivamente sino que son resistentes a la apoptosis, por lo que después del tratamiento el tumor vuelve a aparecer en la recaída. Nos proponemos estudiar la activación de apoptosis inducida por AGI-6780 en las distintas líneas celulares y cultivos primarios analizando la activación de caspasa 3 mediante *western blotting*.

Objetivo 2: Estudio *in vivo* del efecto de AGI-6780 en xenografts con ratones inmunodeprimidos. Un experimento preliminar se establecerá para determinar la tolerancia al tratamiento con AGI-6780, TMZ o ambos combinados. Para cada tratamiento, los ratones inmunodeprimidos se dividirán en cinco grupos de cinco ratones cada uno, y se tratarán diariamente durante 5 días por vía oral con cada fármaco antitumoral. Las dosis oscilará entre 0, 10 y 30 mg/Kg para AGI-6780 (dosis de 30 mg/Kg testada en xenografts de LMA y descrita en Blood: 124 (21), 2014); y 50 mg/Kg para TMZ (dosis similar a la que se suministra en la terapia de humanos). Se determinará el peso de cada animal tres veces a la semana y las tasas de mortalidad se supervisarán durante un mes. Se calcularán LD₁₀ y LD₅₀ por el método de Lichfield-Wilcoxon. LD₀ se calculará utilizando la siguiente ecuación: $Y = KX + b$, donde Y es la dosis del fármaco antitumoral; X, la dosis letal; K, la constante de velocidad específica del fármaco antitumoral y b, la LD₀ calculada. La dosis máxima de tolerancia en los ratones inmunodeprimidos portadores de tumores se define como el 75% de la LD₀.

Una vez estimadas las dosis de estudio, se implantarán en los ratones dos líneas celulares independientemente, SK-N-BE(2) y SH-SY5Y, una de ellas con amplificación de *MYCN* y la otra sin amplificación. Vamos a utilizar ratones atímicos nude (nu/nu) de 8 a 10 semanas de edad, con un peso aproximado de 20 g y con una distribución igual por sexos. Los ratones se obtendrán de Charles River Laboratories. Se emplearán 12 ratones en cada grupo: control, tratados con AGI-6780, TMZ y AGI-6780 más TMZ. El implante de cada línea celular se hará con 10×10^6 células en 200µl de una mezcla (1:1) con Matrigel (BD Biosciences) mediante inyección subcutánea en la zona lumbar con una aguja de 27G aguja. Los ratones estarán anestesiados con isoflurano. Se espera que los xenoinjertos se desarrollen en unas dos semanas (de 50 a 100 mm³). El tratamiento oral se administra diariamente durante los primeros 5 días con la dosis estimada de AGI-6780 y 50 mg/Kg de TMZ. Los tumores se medirán tres veces a la semana utilizando una pinza externa y el volumen se calculará mediante la fórmula: $4\pi/3 \times (\text{longitud}/2) \times (\text{anchura}/2)^2$. Al final del procedimiento los animales serán sacrificados y los tumores serán analizados por términos de tamaño y aspectos patológicos tales como la angiogénesis y se propague a otros tejidos. La TMZ se está utilizando actualmente en niños con neuroblastoma. Sin embargo, todavía no se sabe el efecto de la combinación de TMZ con AGI-6780 en niños. Para analizar el efecto del tratamiento doble en el desarrollo postnatal tenemos la intención de seguir la pérdida de peso corporal en 10P C57Bl/6 ratones. La pérdida de peso corporal causada ya sea por inhibición del crecimiento o por graves defectos de desarrollo es un parámetro fácilmente evaluable que permite el seguimiento en el tiempo sin sacrificar los animales. Esperamos que el tratamiento doble no tenga efectos graves durante el desarrollo postnatal.

Todos los animales se someterán a palpaciones abdominales dos a tres veces semanales para supervisar el desarrollo del tumor. Después del desarrollo del tumor, los animales serán monitoreados de cerca y sacrificados utilizando dióxido de carbono, en los signos de malestar y problemas relacionados con el tumor de acuerdo con los

criterios establecidos y probados por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de nuestra institución.

Objetivo 3: Diseño de dos compuestos miméticos dirigidos contra MYCN y estudio de su actividad biológica en un modelo celular de neuroblastoma. El diseño está basado en la estructura cristalina de la proteína. Se estudiará la actividad biológica de estos compuestos mediante cribado en la línea celular de neuroblastoma SK-N-BE(2) previamente transfectada de manera estable con el elemento de respuesta dirigiendo al gen reportero Luciferasa. Se probará la actividad de cada uno de los compuestos a concentraciones de 10, 30 y 100 nM en placas de cultivo de 96 pocillos en los que el día anterior se sembraron 5000 células SK-N-BE(2)-Luc y se incubarán durante 72 horas antes de realizar ensayos de luciferasa (Promega). Con objeto de distinguir entre el efecto citotóxico del compuesto del debido a la inhibición de MYCN, se comprobará su toxicidad con la línea celular SH-SY5Y, que no sobreexpresa ni tiene amplificado MYCN, mediante ensayos de proliferación XTT según se describe en el objetivo 1. En base a los resultados que se obtengan, se escogerá la estructura biológicamente más activa y se diseñará una familia de 10 nuevos compuestos distintos, con sustituyentes terminales que mejoren las propiedades de torsión/solubilidad. El segundo cribado se realizará para escoger de manera empírica cuál es el que tiene mayor actividad biológica.

PLAN DE CONTINGENCIA

La línea SK-N-BE(2) tiene mutación en P53 y es posible que sea resistente al inhibidor de IDH2. Un problema anticipado es que ninguna de líneas celulares con MYCN amplificado sea sensible al inhibidor de IDH2. Esto pudiera ser debido a que IDH2 no es el principal gen regulado por MYCN. El plan de contingencia para este caso es el llevar a ensayos preclínicos con ratones, el compuesto identificado con el objetivo 3 de este proyecto.

TIEMPO ESTIMADO

El tiempo estimado de desarrollo del proyecto es de 36 meses, 6 meses para el estudio del inhibidor de IDH2 en cultivos celulares, solo o en combinación con otros fármacos como temozolomida o sn-38. Durante los dos primeros años estableceremos cultivos primarios y xenografts derivados de pacientes del hospital La Fe y testaremos el fármaco sólo o en combinación según los resultados obtenidos con líneas celulares. El objetivo 2 llevará 8 meses para su realización. La síntesis de compuestos del objetivo 3 se realizará durante los 12 primeros meses y el resto del objetivo 3 se realizará durante los 2 años siguientes. Los objetivos 1 y 3 se solaparían en el tiempo.

	Tripsina (Gibco)	6	9.8	58.8
	100 Petri dish	3	282.15	846.45
	Vented cap flasks 75cm2	3	85.94	257.82
	Serological pipettes, 2, 5, 10 y 25 ml (VWR)	16	17.35	277.6
	6 well plates	1	343	343
	96 well plates	1	343	343
	PBS w/o Ca/Mg	2	5.74	11.48
	Tips filter 10ml, 200ml, 1000ml	12	55	660
	Gloves	8	18	144
	AGI6780 (50 mg)	5	178	890
	Cell proliferation kit II (XTT)	1	361.25	361.25
Adquisición de ratones nude (CrI:NU-Foxn1^{nu})	#088 (Homozygous)	121	105	11970
Adquisición de ratones C57/Bl6 (C57BL/6NCrI)	#027	24	30	720
	Matrigel	4	211.8	847.2
Servicio animalario	3.8 € animal por mes (promedio de mantenimiento de 2.5 meses)	3.8	343	1303.4
Diseño y adquisición de 13 compuestos	13 compuestos miméticos de MYCN	13	1050	13650
Kit de ensayo de Luciferasa	Sustrato de luciferasa para medir la actividad de MYCN	1	480	480
Costes indirectos (20%)	Servicios de mantenimiento IIS LaFe			19788.66
TOTAL				191435.97

BIBLIOGRAFÍA

1. Canete A, Gerrard M, Rubie H, Castel V, Di Cataldo A, Munzer C, et al. Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(7):1014-9. Epub 2009/01/28.
2. Mueller S, Matthay KK. Neuroblastoma: biology and staging. *Curr Oncol Rep*. 2009;11(6):431-8.
3. Storlazzi CT, Lonoce A, Guastadisegni MC, Trombetta D, D'Addabbo P, Daniele G, et al. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: origin and structure. *Genome research*. 2010;20(9):1198-206. Epub 2010/07/16.
4. George RE, Kenyon RM, McGuckin AG, Malcolm AJ, Pearson AD, Lunec J. Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase, syndecan-1 and a DEAD box gene, DDX1, with N-myc in neuroblastoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Oncogene*. 1996;12(7):1583-7. Epub 1996/04/04.
5. Guo C, White PS, Hogarty MD, Brodeur GM, Gerbing R, Stram DO, et al. Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol*. 2000;35(6):544-6.
6. Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, et al. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene*. 1999;18(35):4948-57.
7. Vandesompele J, Speleman F, Van Roy N, Laureys G, Brinskchmidt C, Christiansen H, et al. Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204

- neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there? *Med Pediatr Oncol.* 2001;36(1):5-10.
8. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. FISH analyses for alterations in chromosomes 1, 2, 3, and 11 define high-risk groups in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2003;41(1):30-5.
 9. Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, et al. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell.* 1983;35(2 Pt 1):359-67. Epub 1983/12/01.
 10. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature.* 1983;305(5931):245-8. Epub 1983/09/15.
 11. Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, Zhang Y, Pearson AD, Matthay KK, et al. Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2009;27(3):365-70. Epub 2008/12/03.
 12. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2009;27(2):289-97. Epub 2008/12/03.
 13. Cetinkaya C, Hultquist A, Su Y, Wu S, Bahram F, Pahlman S, et al. Combined IFN-gamma and retinoic acid treatment targets the N-Myc/Max/Mad1 network resulting in repression of N-Myc target genes in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Molecular cancer therapeutics.* 2007;6(10):2634-41. Epub 2007/10/17.
 14. Hammerle B, Yanez Y, Palanca S, Canete A, Burks DJ, Castel V, et al. Targeting neuroblastoma stem cells with retinoic acid and proteasome inhibitor. *PloS one.* 2013;8(10):e76761. Epub 2013/10/12.
 15. Beltran H. The N-myc Oncogene: Maximizing its Targets, Regulation, and Therapeutic Potential. *Molecular cancer research : MCR.* 2014;12(6):815-22. Epub 2014/03/05.
 16. Zimmerman KA, Yancopoulos GD, Collum RG, Smith RK, Kohl NE, Denis KA, et al. Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature.* 1986;319(6056):780-3. Epub 1986/02/05.
 17. Malynn BA, de Alboran IM, O'Hagan RC, Bronson R, Davidson L, DePinho RA, et al. N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes & development.* 2000;14(11):1390-9. Epub 2000/06/03.
 18. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science.* 1991;251(4998):1211-7. Epub 1991/03/08.
 19. Wenzel A, Cziepluch C, Hamann U, Schurmann J, Schwab M. The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *The EMBO journal.* 1991;10(12):3703-12. Epub 1991/12/01.
 20. Savino M, Annibali D, Carucci N, Favuzzi E, Cole MD, Evan GI, et al. The action mechanism of the Myc inhibitor termed Omomyc may give clues on how to target Myc for cancer therapy. *PloS one.* 2011;6(7):e22284. Epub 2011/08/04.
 21. Sloane DA, Trikić MZ, Chu ML, Lamers MB, Mason CS, Mueller I, et al. Drug-resistant aurora A mutants for cellular target validation of the small molecule kinase inhibitors MLN8054 and MLN8237. *ACS chemical biology.* 2010;5(6):563-76. Epub 2010/04/30.

22. Beltran H, Rickman DS, Park K, Chae SS, Sboner A, MacDonald TY, et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer discovery*. 2011;1(6):487-95. Epub 2012/03/06.
23. Brockmann M, Poon E, Berry T, Carstensen A, Deubzer HE, Rycak L, et al. Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma. *Cancer cell*. 2013;24(1):75-89. Epub 2013/06/25.
24. Hatzi E, Murphy C, Zoepfel A, Ahorn H, Tontsch U, Bamberger AM, et al. N-myc oncogene overexpression down-regulates leukemia inhibitory factor in neuroblastoma. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2002;269(15):3732-41. Epub 2002/08/03.
25. Bjerke L, Mackay A, Nandhabalan M, Burford A, Jury A, Popov S, et al. Histone H3.3. mutations drive pediatric glioblastoma through upregulation of MYCN. *Cancer discovery*. 2013;3(5):512-9. Epub 2013/03/30.
26. Walton MI, Eve PD, Hayes A, Valenti MR, De Haven Brandon AK, Box G, et al. CCT244747 is a novel potent and selective CHK1 inhibitor with oral efficacy alone and in combination with genotoxic anticancer drugs. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(20):5650-61. Epub 2012/08/30.
27. Schaap FG, French PJ, Bovee JV. Mutations in the isocitrate dehydrogenase genes IDH1 and IDH2 in tumors. *Advances in anatomic pathology*. 2013;20(1):32-8. Epub 2012/12/13.
28. Tomita A. Progress in molecularly targeted therapies for acute myeloid leukemia. [Rinsho ketsueki] *The Japanese journal of clinical hematology*. 2015;56(2):130-8. Epub 2015/03/15.
29. Terunuma A, Putluri N, Mishra P, Mathe EA, Dorsey TH, Yi M, et al. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(1):398-412. Epub 2013/12/10.
30. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, et al. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer research*. 2005;65(3):828-34. Epub 2005/02/12.
31. Park JH, Szemes M, Vieira GC, Meleg Z, Malik S, Heesom KJ, et al. Protein arginine methyltransferase 5 is a key regulator of the MYCN oncoprotein in neuroblastoma cells. *Molecular oncology*. 2015;9(3):617-27. Epub 2014/12/06.
32. Yang J, Altahan AM, Hu D, Wang Y, Cheng PH, Morton CL, et al. The role of histone demethylase KDM4B in Myc signaling in neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(6):dju080. Epub 2015/05/01.
33. Perini G, Diolaiti D, Porro A, Della Valle G. In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(34):12117-22. Epub 2005/08/12.
34. Nair SK, Burley SK. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell*. 2003;112(2):193-205. Epub 2003/01/30.
35. Yin H, Hamilton AD. Strategies for targeting protein-protein interactions with synthetic agents. *Angewandte Chemie*. 2005;44(27):4130-63. Epub 2005/06/15.
36. Davis JM, Tsou LK, Hamilton AD. Synthetic non-peptide mimetics of alpha-helices. *Chemical Society reviews*. 2007;36(2):326-34. Epub 2007/02/01.