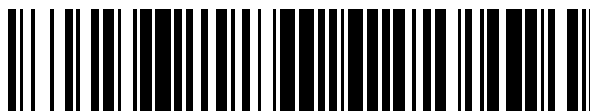


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 915**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2005** **E 09173161 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 2228452**

54 Título: **P53 natural como biomarcador para el tratamiento con inhibidores de mTOR en combinación con un agente citotóxico**

30 Prioridad:

**23.02.2004 US 546856 P**

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

**16.09.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)**

**Lichtstrasse 35**

**4056 Basel, CH y**

**NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG,**

**ZWEIGNIEDERLASSUNG FRIEDRICH MIESCHER**

**INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BEUVINK, IWAN;**

**BOULAY, ANNE;**

**LANE, HEIDI;**

**O'REILLY, TERENCE y**

**THOMAS, GEORGE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 494 915 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

P53 natural como biomarcador para el tratamiento con inhibidores de mTOR en combinación con un agente citotóxico.

5 La presente invención se refiere a biomarcadores para determinar la sensibilidad de enfermedades proliferativas tales como cáncer a agentes terapéuticos, en particular inhibidores de mTOR en combinación con un agente citotóxico.

10 Un número de inhibidores de mTOR tienen potentes propiedades antiproliferativas que los hacen útiles para la quimioterapia del cáncer, particularmente de tumores sólidos, especialmente de tumores sólidos avanzados. Los inhibidores de mTOR también se han combinado con ciertos agentes citotóxicos para mejorar adicionalmente la eficacia del tratamiento o para reducir los efectos secundarios, p. ej. como se divulga en WO 02/66019. Sin embargo, todavía hay una necesidad de un uso más dirigido de una terapia combinada basada en inhibidores de mTOR, que requiere la identificación de pacientes que son propensos a responder al tratamiento con tales agentes combinados. Según esto, hay una necesidad de biomarcadores útiles, p. ej., en pruebas clínicas, que sean capaces de predecir la capacidad de respuesta de una enfermedad proliferativa benigna o maligna, p. ej. un tumor en un paciente, al tratamiento con un inhibidor de mTOR asociado con un agente citotóxico.

20 Sorprendentemente, se ha encontrado que la presencia de un gen supresor de tumores de p53 natural (por otra parte también conocido como el gen *TP53*) es un biomarcador útil que pronostica la sensibilidad de enfermedades proliferativas al tratamiento con una combinación de un inhibidor de mTOR con un agente citotóxico. En particular, se ha encontrado que la presencia de un gen de p53 natural en líneas celulares de cáncer humano se correlaciona bien con la destrucción celular/muerte celular programada/apoptosis incrementadas resultantes del tratamiento con un inhibidor de mTOR en combinación con un agente citotóxico que daña o afecta a la integridad del ADN. De ahí que los inhibidores de mTOR combinados con un agente citotóxico sean más propensos a mostrar un efecto antiproliferativo/de destrucción celular más significativo cuando se usan para tratar células cancerosas que retienen p53 natural. La proteína p53 (codificada por el gen *TP53*) es un supresor de tumores que representa un papel principal en la regulación de la interrupción del ciclo celular, la senescencia, la diferenciación y la muerte celular programada/apoptosis en células de mamífero. En particular, la ruta de p53 induce la interrupción del ciclo celular y/o la apoptosis en células de mamífero expuestas a estrés (p. ej. daño al ADN, estrés oncogénico, hipoxia, falta de señales de supervivencia). Se producen mutaciones en *TP53* aproximadamente en la mitad de todos los cánceres humanos, y la capacidad para inducir una respuesta a p53 está comprometida en muchas células cancerosas (Vousden y Lu, Nature Reviews, 2002,2:594-604). La secuencia de p53 humana (mARN [secuencia codificante; 1.182 nucleótidos] y la proteína [393 aminoácidos]) está disponible bajo los números de registro del GenBank NM 000546 o P04637. La secuencia completa del gen *TP53* humano está disponible con el número de registro del GenBank U94788.

35 Según esto, la presente invención se basa en la determinación de la presencia de un gen de p53 (*TP53*) natural en células que tienden a una proliferación anormal.

La presente invención proporciona en un aspecto el uso de la presencia de gen de p53 (*TP53*) natural (en oposición a la ausencia, deficiencia o supresión del gen de p53 [*TP53*] o la presencia de un gen de p53 [*TP53*] mutado) como un biomarcador para determinar la sensibilidad de una enfermedad proliferativa al tratamiento con un inhibidor de mTOR en combinación con un agente citotóxico.

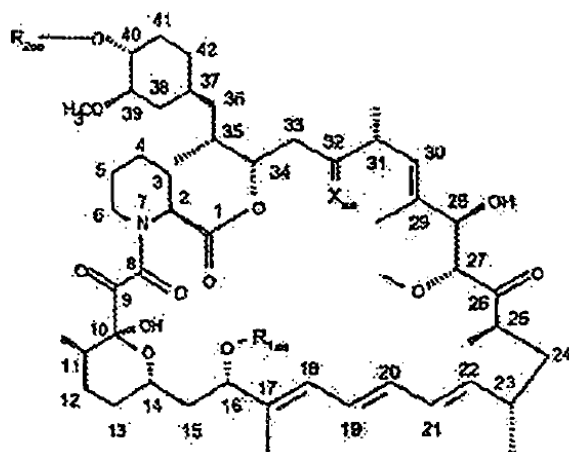
40 Por gen de p53 (*TP53*) natural se entiende no solo los intrones y exones sino también regiones reguladoras asociadas con, y físicamente cercanas a, los intrones y exones, particularmente las 5' al exón más 5'. Incluye, p. ej., la secuencia de ADN de longitud completa del gen natural y opcionalmente sustituciones (incluyendo inversiones) de nucleótidos, inserciones y supresiones de codones, con tal de que exprese la proteína p53 natural o un equivalente funcional de la misma, p. ej. una proteína p53 funcional que retenga sus propiedades inductoras de la apoptosis. A la inversa, la ausencia, deficiencia, supresión o mutación del gen de p53 (*TP53*) significa cambios genéticos y epigenéticos, p. ej. amplificación, metilación, polimorfismos, mutaciones, supresiones, inversiones o traslocaciones de nucleótidos y pérdida de heterocigotidad (LOH, por sus siglas en inglés) que da como resultado pérdida de expresión del gen de p53 (*TP53*) o expresión de un gen mutado que, p. ej., da como resultado la expresión de una proteína p53 mutada que ya no retiene propiedades inductoras de la apoptosis.

50 En un aspecto adicional la invención proporciona un método para determinar la sensibilidad de una enfermedad proliferativa en un sujeto al tratamiento con un inhibidor de mTOR en combinación con un agente citotóxico, que comprende determinar el estado de p53 (*TP53*) (natural frente a mutante o deficiente/ausente) en una muestra derivada del sujeto.

55 En otro aspecto la invención proporciona un método para seleccionar sujetos que sufren una enfermedad proliferativa para el tratamiento con un inhibidor de mTOR en asociación con un agente citotóxico, que comprende

determinar la sensibilidad de la enfermedad proliferativa al tratamiento combinado en cada sujeto mediante un método como el descrito anteriormente, y seleccionar aquellos sujetos que retienen un gen de p53 (*TP53*) natural para dicho tratamiento combinado.

- 5 El término "inhibidor de mTOR", según se usa en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, rapamicina (sirolimus) o un derivado de la misma. La rapamicina es un antibiótico macrólido conocido producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Derivados adecuados de rapamicina incluyen, p. ej., compuestos de fórmula A



A

en la que

$R_{1aa}$  es  $CH_3$  o alquínilo  $C_{3-6}$ ,

- 10  $R_{2aa}$  es H o  $-CH_2-CH_2-OH$ , 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metil-propanoílo o tetrazolilo, y

$X_{aa}$  es =O, (H,H) o (H,OH)

con tal de que  $R_{2aa}$  sea distinto de H cuando  $X_{aa}$  sea =O y  $R_{1aa}$  sea  $CH_3$ .

o un profármaco de los mismos cuando  $R_{2aa}$  sea  $-CH_2-CH_2-OH$ , p. ej. un éter fisiológicamente hidrolizable de los mismos.

- 15 Compuestos de fórmula A se divulgan, p. ej., en WO 94/09010, WO 95/16691, WO 96/41807, USP 5.362.718 o WO 99/15530 que se incorporan en la presente memoria mediante referencia. Se pueden preparar como se divulga o por analogía con procedimientos descritos en estas referencias.

- 20 Derivados de rapamicina de fórmula I representativos son, p. ej., 32-desoxorapamicina, 16-pent-2\*-iniloxi-32-desoxorrapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S o R)-dihidro-rapamicina, 16-pent-2-iniloxi-32(S o R)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina (también llamada CCI779) o 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina (también llamada ABT578). Un compuesto preferido es, p. ej., 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina divulgada en el Ejemplo 8 en WO 94/09010, o 32-desoxorrapamicina o 16-pent-2-iniloxi-32(S)-dihidro-rapamicina como las divulgadas en WO 96/41807. Los derivados de rapamicina también pueden incluir los llamados rapálogos, p. ej. como los divulgados en WO 98/02441 y WO01/14387, p. ej. AP23573, AP23464, AP23675 o AP23841. Ejemplos adicionales de un derivado de rapamicina son los divulgados bajo el nombre TAFE-93 (un profármaco de rapamicina), biolimus-7 o biolimus-9.

- 30 En cada caso, cuando se citen solicitudes de patente o publicaciones científicas, la materia relativa a los compuestos se incorpora por la presente en esta solicitud mediante referencia. Asimismo, están comprendidas las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, los correspondientes racematos, diastereoisómeros, enantiómeros, tautómeros así como las correspondientes modificaciones cristalinas de los compuestos divulgados anteriormente cuando estén presentes, p. ej. solvatos, hidratos y polimorfos, que se divulgan en la presente memoria. Los compuestos usados como ingredientes activos en las combinaciones de la invención se pueden preparar y administrar como se describe en los documentos citados, respectivamente.

- 35 El término "agente citotóxico", según se usa en la presente memoria, es un agente que es dañino para la estructura y la función de las células, p. ej. que daña o afecta a la integridad del ADN, y finalmente puede provocar la muerte

celular, p. ej. un agente antineoplástico, pongamos por caso un agente activo para los microtúbulos o especialmente un fármaco que daña el ADN, por ejemplo un antimetabolito antineoplástico, un compuesto de platino, un agente alquilante o un inhibidor de topoisomerasa I o II. El término "agente citotóxico" también incluye un tratamiento de irradiación que provoca daño al ADN, p. ej. radiación ionizante, p. ej. yodo radiactivo. Tal tratamiento de irradiación también puede estar combinado con la terapia con un agente citotóxico. El término "agente citotóxico" también incluye uno, dos o más agente citotóxicos que se pueden administrar en la forma de una terapia en forma de "cóctel".

El término "inhibidor de topoisomerasa I", según se usa en la presente memoria, incluye, pero no se limita a topotecán, irinotecán, gimatecán, 9-nitrocampotecina y el conjugado de campotecina macromolecular PNU-166148 (compuesto A1 en WO99/17804). El irinotecán se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial CAMPTOSAR™. El topotecán se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial HYCAMTIN™.

El término "inhibidor de topoisomerasa II", según se usa en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, las antraciclinas tales como doxorubicina (incluyendo una formulación liposómica, p. ej. CAELYX™), daunorubicina, epirubicina, idarubicina y nemorubicina, las antraquinonas mitoxantrona y losoxantrona, y las podofilotoxinas etopósido y tenipósido. El etopósido se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial ETOPOPHOS™. El tenipósido se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial VM 26-BRISTOL™. La doxorubicina se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial ADRIBLASTIN™. La epirubicina se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial FARMORUBICIN™. La idarubicina se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial ZAVEDOS™. La mitoxantrona se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial NOVANTRON™.

El término "agente activo para los microtúbulos" se refiere a agentes estabilizantes de los microtúbulos y desestabilizantes de los microtúbulos, incluyendo, pero no limitados a, taxanos, p. ej. paclitaxel y docetaxel, alcaloides de la vinca, p. ej., vinblastina, especialmente sulfato de vinblastina, vincristina, especialmente sulfato de vincristina, y vinorelbina, discodermolidas y epotilonas y derivados de las mismos, p. ej. epotilona B o un derivado de la misma. El paclitaxel se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. TAXOL™. El docetaxel se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial TAXOTERE™. El sulfato de vinblastina se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial VINBLASTIN R.P.™. El sulfato de vincristina se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial FARMISTIN™. La discodermolida se puede obtener, p. ej., como se divulga en US 5.010.099.

El término "agente alquilante", según se usa en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán o nitrosourea (BCNU o Gliadel™). La ciclofosfamida se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial CYCLOSTIN™. La ifosfamida se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial HOLOXAN™.

El término "antimetabolito antineoplástico" incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, tegafur, capecitabina, cladribina, citaribina, fosfato de fludarabina, fluorouridina, gemcitabina, 6-mercaptopurina, hidroxiaurea, metotrexato, edatrexato y sales de tales compuestos, y además ZD1694 (RALITREXED™), LY231514 (ALIMTA™), LY264618 (LOMOTREXOL™) y OGT719. La capecitabina se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial XELODA™. La gemcitabina se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial GEMZAR™.

El término "compuesto de platino", según se usa en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, carboplatino, cisplatino y oxaliplatino. El carboplatino se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial CARBOPLAT™. El oxaliplatino se puede administrar, p. ej., en la forma en la que se comercializa, p. ej. bajo la marca comercial ELOXATIN™.

La enfermedad proliferativa puede ser una enfermedad proliferativa benigna o maligna, p. ej. hiperplasia prostática benigna, o una enfermedad neoplásica, preferiblemente una enfermedad proliferativa maligna, p. ej. un cáncer, p. ej. tumores y/o metástasis (donde quiera que estén situados), p. ej. tumores cerebrales y otros tumores del sistema nervioso central (p. ej. tumores de las meninges, el cerebro, la médula espinal, los nervios craneales y otras partes del sistema nervioso central, p. ej. glioblastomas o blastomas medulares); cáncer de cabeza y/o cuello; tumores de mama; tumores del sistema circulatorio (p. ej. tumores de corazón, mediastino y pleura, y otros órganos intratorácicos, tumores vasculares y tejido vascular asociado a tumores); tumores del sistema excretor (p. ej. riñón, pelvis renal, uréter, vejiga urinaria, otros órganos urinarios y órganos urinarios no especificados); tumores del tracto gastrointestinal (p. ej. esófago, estómago, intestino delgado, colon, colorrectal, unión rectosigmoidea, recto, ano y canal anal), tumores que implican el hígado y los conductos biliares intrahepáticos, vesícula biliar, otras partes del tracto biliar y partes del tracto biliar no especificadas, páncreas, otros órganos y órganos digestivos); cabeza y

5 cuello; cavidad oral (labio, lengua, encía, suelo de la boca, paladar y otras partes de la boca, glándula parótida, y otras partes de las glándulas salivares, lengua, orofaringe, nasofaringe, seno piriforme, hipofaringe, y otras zonas del labio, la cavidad oral y la faringe); tumores del sistema reproductor (p. ej. vulva, vagina, cuello uterino, cuerpo uterino, útero, ovario y otras zonas asociadas con los órganos genitales femeninos, placenta, pene, próstata, testículos y otras zonas asociadas con los órganos genitales masculinos); tumores del tracto respiratorio (p. ej., cavidad nasal y oído medio, senos accesorios, laringe, tráquea, bronquio y pulmón, p. ej. cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico); tumores del sistema esquelético (p. ej. hueso y cartílago articular de los miembros, cartílago articular óseo y otras zonas); tumores de piel (p. ej. melanoma de piel maligno, cáncer de piel no melanómico, carcinoma de piel de células basales, carcinoma de piel de células escamosas, mesotelioma, sarcoma de Kaposi); y tumores que implican otros tejidos incluyendo nervios periféricos y el sistema nervioso autónomo, tejido conectivo y blando, retroperitoneo y peritoneo, ojo y anejos, tiroides, glándula suprarrenal y otras glándulas endocrinas y estructuras relacionadas, neoplasma maligno secundario e inespecífico de los nódulos linfáticos, neoplasma maligno secundario de los sistemas respiratorio y digestivo y neoplasma maligno secundario de otras zonas, tumores del sistema sanguíneo y linfático (p. ej. enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Burkitt, linfomas relacionados con el sida, enfermedades inmunoproliferativas malignas, mieloma múltiple y neoplasmas malignos de células plasmáticas, leucemia linfoide, leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfocítica aguda o crónica, leucemia monocítica, otras leucemias de tipo celular especificado, leucemia de tipo celular no especificado, otros neoplasmas malignos de tejidos linfoide, hematopoyético y relacionados y neoplasmas malignos de tejidos linfoide, hematopoyético y relacionados no especificados, por ejemplo linfoma de células grandes difuso, linfoma de células T o linfoma de células T cutáneo). El cáncer mieloide incluye, p. ej., leucemia mieloide aguda o crónica.

Cuando se mencione en la presente memoria anteriormente y posteriormente un tumor, una enfermedad tumoral, un carcinoma o un cáncer, también están implicadas alteARNtivamente o además metástasis en el órgano o tejido original y/o en cualquier otra localización, cualquiera que sea la localización del tumor y/o la metástasis.

25 El término agente citotóxico también puede ser, en el caso de un cáncer linfático o mieloide, p. ej., busulfano, citarabina, 6-tioguanina, fludarabina, hidroxixurea, procarbina, bleomicina o metotrexato. Inhibidores de topoisomerasa II, p. ej. daunorubicina o idarubicina o, particularmente, compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de PDGFR o de miembros de la familia c-Abl y sus productos de fusión génica, p. ej. imatinib, inhibidores de farnesiltransferasa, Ara-C, VP-16, tenipósido, mitoxantrona, carboplatino o midoestaurina se prefieren como agente citotóxico en el caso de un cáncer linfático o mieloide.

35 Según el método de la presente invención, sujetos que sufren una de tales enfermedades proliferativas se pueden identificar sistemáticamente para predecir su sensibilidad a un tratamiento combinado de inhibidores de mTOR con un agente citotóxico. El método se puede realizar *in vitro*, p. ej. sobre una muestra de tejido biológico derivada del sujeto. La muestra puede ser cualquier material biológico separado del cuerpo del mamífero tal como, p. ej., un tejido, líneas celulares, plasma o suero, lisado celular o tisular, preferiblemente un tejido tumoral.

40 El estado del gen de p53 (*TP53*) se ensaya en la muestra biológica por cualquier medio técnico basado, p. ej., en el análisis de ADN con respecto a cambios genéticos y epigenéticos, p. ej., exploración de ADN con respecto a la amplificación, metilación, polimorfismos, mutaciones nucleotídicas (p. ej., mutaciones de los codones 175Arg, 245Gly, 248Arg, 249Arg, 273Arg, 282Arg u otros), supresiones, inversiones y/o traslaciones nucleotídicas y pérdida de heterocigotidad (LOH), el estado de p53 (*TP53*) se ensaya en las muestras biológicas por cualquier medio técnico basado, p. ej., en la expresión de ARN usando, por ejemplo, las técnicas de transferencia Northern o RT-PCR o basadas en, p. ej., expresión/modificaciones de proteínas usando, por ejemplo, la técnica de transferencia Western, inmunohistoquímica o ELISA, incluyendo inmunoensayos, inmunoprecipitación y ensayos de electroforesis.

45 Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos específicos para la proteína p53 o modificaciones postraduccionales de p53 tales como fosforilación (p. ej., fosforilación de Ser46), ubiquitinación o acetilación en un formato de inmunoensayo estándar para medir los niveles de proteína p53/fosforilación/ubiquitinación/acetilación. También se utilizan ensayos tipo ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), ensayos de tipo inmunoprecipitación, ensayos de transferencia Western convencionales y ensayos de inmunohistoquímica que usan, p. ej., anticuerpos monoclonales o policlonales para determinar los niveles de proteína p53/modificaciones postraduccionales como un biomarcador.

50 Anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para proteína p53/modificaciones postraduccionales se producen según métodos de inmunización conocidos o están disponibles comercialmente (p. ej., nº de catálogo de Santa Cruz Biotechnology Inc sc6253).

55 El estado de p53 también se puede medir mediante electroforesis en gel bidimensional (2-D). La electroforesis en gel 2-D se conoce en la técnica y típicamente implica enfoque isoeléctrico (IEF, por sus siglas en inglés) a lo largo de una primera dimensión seguido por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico) a lo largo de una segunda dimensión. Los electroferogramas resultantes se analizan, por ejemplo, mediante análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos.

La presente invención proporciona así un método para identificar sistemáticamente sujetos que sufren una enfermedad proliferativa a fin de predecir su capacidad de respuesta a un tratamiento combinado con un inhibidor de mTOR y un agente citotóxico, que comprende determinar el estado de p53 (*TP53*) mediante un método como el definido anteriormente.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad proliferativa en un sujeto que lo necesite, que comprende determinar el estado del gen de p53 (*TP53*) o el nivel de expresión y/o modificaciones postraduccionales de p53 en una muestra derivada del sujeto, mediante un método como el descrito anteriormente, y tratar al sujeto con un inhibidor de mTOR en combinación con un agente citotóxico según esto.

10 En una realización *alteARN*tiva, la presente invención proporciona un método para aumentar la actividad de un agente citotóxico o para vencer la resistencia a un agente citotóxico en un sujeto que lo necesite, que comprende determinar el estado del gen/la expresión de p53 (*TP53*) en una muestra derivada de un sujeto, mediante un método como el descrito anteriormente, y administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de mTOR, bien concomitantemente o bien secuencialmente con dicho agente citotóxico.

15 El estado de p53 (*TP53*) en un tejido particular procedente de un sujeto, p. ej. una muestra de tejido tumoral, se puede comparar con una muestra de referencia, p. ej. una muestra de tejido normal procedente de un sujeto que no sufre la enfermedad, o una muestra de tejido normal (es decir, no tumoral) procedente del mismo sujeto. El nivel de estado natural de p53 (*TP53*) en el que está indicado el uso de un inhibidor de mTOR en asociación con un agente citotóxico es un pronóstico de un efecto terapéutico beneficioso (es decir, un efecto antiproliferativo y/o de destrucción celular incrementada) de un tratamiento combinado de un inhibidor de mTOR con un agente citotóxico.

20 Por otra parte, el método se puede usar para ayudar en la selección de una dosis apropiada de un agente citotóxico y/o un inhibidor de mTOR a fin de optimizar individualmente la terapia para cada paciente. Dependiendo del estado natural de p53 en un paciente, se pueden usar dosis inferiores de los ingredientes activos de la combinación; por ejemplo, las dosificaciones a menudo no solo necesitan ser menores sino que también se pueden aplicar menos frecuentemente, o se pueden usar a fin de disminuir la incidencia de efectos secundarios, mientras se controla la proliferación no deseada. Factores a considerar en este contexto incluyen la afección particular que se trate, el mamífero particular que se esté tratando, la condición clínica del paciente individual, la zona de aporte de los compuestos activos, el tipo particular de los compuestos activos, el método de administración, el esquema de administración, la gravedad de la afección y otros factores conocidos por los profesionales médicos.

30 Los términos "tratamiento combinado" o "en combinación con" o "en asociación con" o similares que se utilizan en la presente memoria están destinados a abarcar la administración del inhibidor de mTOR y el agente citotóxico seleccionados a un solo paciente, y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente mediante la misma ruta de administración o al mismo tiempo. Por ejemplo, el inhibidor de mTOR y el agente citotóxico se pueden administrar a un paciente como entidades separadas bien simultáneamente, bien concurrentemente o bien secuencialmente sin límites de tiempo específicos, en donde tal administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo.

La cantidad terapéuticamente eficaz de cada componente activo de la combinación que se va a administrar estará gobernada por consideraciones como las mencionadas anteriormente, y en la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar la enfermedad. Tal cantidad está preferiblemente por debajo de la cantidad que es tóxica para el huésped o que hace al huésped más predisuesto a infecciones.

40 Dosis apropiadas de un inhibidor de mTOR, p. ej. según se divulga en WO 02/66019, son, p. ej., cantidades de dosificación diarias del orden de alrededor de 0,1 a 30 mg, p. ej. de alrededor de 0,05 a 20 mg de ingrediente activo por vía oral, como una sola dosis o en dosis divididas o intermitentemente, p. ej. una vez a la semana. La rapamicina o un derivado de la misma, p. ej. un compuesto de fórmula A, se puede administrar mediante cualquier vía convencional, en particular enteralmente, p. ej. oralmente, p. ej. en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones de bebida, o parenteralmente, p. ej. en forma de soluciones o suspensiones inyectables, que contienen, por ejemplo, de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,9%, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 60%, del ingrediente o los ingredientes activos.

50 El topotecán se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 1 a 5 mg/m<sup>2</sup>/día. El irinotecán se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 350 mg/m<sup>2</sup>/día.

El paclitaxel se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 300 mg/m<sup>2</sup>/día. El docetaxel se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 25 a 100 mg/m<sup>2</sup>/día.

La ciclofosfamida se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de

aproximadamente 50 a 1.500 mg/m<sup>2</sup>/día. El melfalán se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 0,5 a 10 mg/m<sup>2</sup>/día.

5 El 5-fluorouracilo se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 1.000 mg/m<sup>2</sup>/día, p. ej. 500 mg/m<sup>2</sup>/día. La capecitabina se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 10 a 1.000 mg/m<sup>2</sup>/día. El hidroclicloruro de gemcitabina se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 1.000 mg/m<sup>2</sup>/semana.

10 El carboplatino se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 200 a 400 mg/m<sup>2</sup> aproximadamente cada cuatro semanas. El cisplatino se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 25 a 75 mg/m<sup>2</sup> aproximadamente cada tres semanas. El oxaliplatino se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosificación que varía de aproximadamente 50 a 85 mg/m<sup>2</sup> cada dos semanas.

El imatinib se puede administrar a un ser humano en una dosificación en el intervalo de aproximadamente 2,5 a 850 mg/día, más preferiblemente de 5 a 600 mg/día y lo más preferiblemente de 20 a 300 mg/día.

15 Una combinación preferida para ser usada en un método según la invención es, p. ej., una combinación de rapamicina, 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina o 40-O-(2-hidroxietil)rapamicina con un agente citotóxico tal como gemcitabina o cisplatino. Una combinación *alteARN*tiva para ser usada en un método según la invención es una combinación en cantidades sinérgicas de un inhibidor de mTOR con un agente citotóxico, p. ej. gemcitabina o cisplatino, p. ej. según se divulga anteriormente.

20 Preferiblemente, el gen humano es *TP53*.

Preferiblemente, los métodos de la invención se realizan sobre células tumorales que presentan un estado natural de p53 (*TP53*).

25 En una realización adicional, se ha encontrado sorprendentemente que la destrucción celular/muerte celular programada/apoptosis incrementada resultante del tratamiento con un inhibidor de mTOR en combinación con un agente citotóxico en células naturales p53 (*TP53*) está asociado con una fuerte atenuación de la regulación al alza inducida por citotoxicidad de la expresión de la proteína p21<sup>Walf/Cip1</sup> (también conocida como CDKN1A, WAF1, CIP1, SDI1, CAP20, MDA-6, p21), denominada en la presente posteriormente p21.

30 p21 es un miembro de la familia *cip/kip* de "inhibidores" ciclina cinasa, que representa un papel en permitir el tránsito del ciclo celular así como prevenir la apoptosis. En el contexto de la presente invención, está bien establecida la función de p21 para detener el crecimiento celular en respuesta a señales de estrés, p. ej. daño al ADN, en respuesta a p53 activada. En efecto, se postula que la expresión incrementada de proteína p21 permite que tales células estresadas sobrevivan, p. ej. permitiendo que la célula complete el proceso de reparación de ADN. De ahí que la atenuación de la expresión incrementada de p21 en respuesta al tratamiento con citotóxicos pueda promover la destrucción celular/muerte celular programada/apoptosis (Weiss, *Cancer Cell*, 2003,4:425-429). La secuencia de p21 humana (mARN [secuencia codificante: 495 nucleótidos] y el producto proteínico [164 aminoácidos]) está disponible bajo el número de registro del GenBank NM 000389, NM 078467 o AAH01935. La secuencia completa del gen de p21 humano está disponible bajo el número de registro del GenBank NM 078467.

40 Por otra parte, algunos pacientes con cáncer tienen expresión incrementada de p21 tumoral total o citosólica que se ha relacionado con un pronóstico pobre y una pobre respuesta a la quimioterapia (Weiss, anteriormente). La determinación de la expresión de p21 basal en un paciente con cáncer también puede permitir seleccionar a los pacientes para un tratamiento quimioterapéutico específico, p. ej. basado en terapia de mTOR en combinación con uno o más agentes citotóxicos y opcionalmente radioterapia.

El presente Ejemplo ilustra la invención.

### Ejemplo 1

45 Células tumorales de adenocarcinoma humano A549 naturales que expresan p53 (*TP53*) (CCL-185) (American Type Culture Collection, Rockville, MD., EE. UU. de A.) se siembran a una densidad de  $2 \times 10^3$  células/100  $\mu$ l por pocillo en placas de 96 pocillos y se incuban durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se incuban con concentraciones subóptimas de gemcitabina (p. ej. de 5 a 17,5 nM) bien en combinación con 40-O-(2-hidroxietil)rapamicina 20 nM o bien con el DMSO como vehículo de referencia durante 72 horas adicionales. Se  
50 añade colorante YO-PRO (yoduro YO-PROR-1 [491/509], nº cat. Y3603, Molecular Probes) a las células y se usa un lector de placas Cytofluor II Fluorescence para determinar la muerte celular o la citotoxicidad y, después de la lisis celular, la proliferación celular relativa. En este ensayo, el inhibidor de mTOR, p. ej. 40-O-(2-hidroxietil)rapamicina,

provoca una potenciación estadísticamente significativa del efecto de destrucción celular de concentraciones subóptimas de gemcitabina ( $p < 0,05$ ; ANOVA con prueba de Tukey). Se obtienen resultados similares a los divulgados anteriormente cuando se usa una línea celular natural que expresa p53 (*TP53*) distinta al adenocarcinoma pulmonar humano A549, p. ej. células de carcinoma de mama MCF7 humano (HTB-22; American Type Culture Collection).

Sin embargo, este procedimiento se repite con el uso de líneas celulares tumorales mutadas/deficientes en p53 (*TP53*), p. ej. células de carcinoma de próstata humano PC3M (sembradas a una densidad de  $0,8 \times 10^3$  células/100  $\mu$ l) o células de carcinoma de mama humano MDA-MB231 (sembradas a una densidad de  $2 \times 10^3$  células/100  $\mu$ l; HTB-26; American Type Culture Collection). No se observa una potenciación notable o constante de la muerte celular en líneas celulares mutadas/deficientes en p53 (*TP53*).

Se siembran células A549 a una densidad de  $0,1 \times 10^6$  células/10 ml por placas de 10 cm y se incuban durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se incuban con concentraciones subóptimas de gemcitabina (p. ej., de 5 a 12,5 nM) bien en combinación con 40-O-(2-hidroxiethyl)rapamicina 20 nM o bien con DMSO como vehículo de referencia durante 72 horas adicionales. Se resuelven extractos celulares correspondientes a 50 pg de proteína total mediante electroforesis SDS al 8%-PAGE y se realiza un análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales de conejo producidos contra Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) (nº de catálogo de Cell Signalling Technology 9542). En este ensayo, la presencia del inhibidor de mTOR, p. ej., 40-O-(2-hidroxiethyl)rapamicina, provoca una escisión incrementada de PARP (un marcador de la apoptosis) a concentraciones subóptimas de gemcitabina (en comparación con gemcitabina o el inhibidor de mTOR solos a las mismas concentraciones). Esto confirma los resultados anteriores de que, en las células A549 naturales que expresan p53 (*TP53*), la presencia del inhibidor de mTOR da como resultado niveles superiores de muerte celular a concentraciones subóptimas de gemcitabina.

### Ejemplo 2

Células de adenocarcinoma pulmonar humano A549 naturales que expresan p53 (*TP53*) se siembran a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/100  $\mu$ l por pocillo en placas de 96 pocillos y se incuban durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se incuban con concentraciones subóptimas de cisplatino (p. ej. de 3 a 10  $\mu$ g/ml) bien en combinación con 40-O-(2-hidroxiethyl)rapamicina 20 nM o bien con el DMSO como vehículo de referencia durante 24 horas adicionales. Se realiza el ensayo YO-PRO® como anteriormente para determinar la muerte celular o la citotoxicidad y, después de la lisis celular, la proliferación celular relativa. En este ensayo, el inhibidor de mTOR, p. ej. 40-O-(2-hidroxiethyl)rapamicina, provoca una potenciación estadísticamente significativa del efecto de destrucción celular de concentraciones subóptimas de cisplatino ( $p < 0,05$ ; ANOVA con prueba de Tukey). El análisis posterior usando ANOVA biunívoco indica que la interacción entre RAD001 y cisplatino era muy significativa ( $p < 0,001$ ). Se obtienen resultados similares a los divulgados anteriormente cuando se usa una línea celular natural que expresa p53 (*TP53*) distinta al adenocarcinoma pulmonar humano A549, p. ej. células de carcinoma de mama MCF7 humano. En el último caso, la incubación con los compuestos es durante 30 horas.

Sin embargo, este procedimiento se repite con el uso de líneas celulares tumorales mutadas/deficientes en p53 (*TP53*), p. ej. PC3M (sembradas a una densidad de  $3 \times 10^3$  células/100  $\mu$ l) o DU145 (sembradas a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/100  $\mu$ l; HTB-81; American Type Culture Collection). La incubación con los compuestos en este caso es de 22 horas para DU145 o 30 horas para PC3M. No se observa una potenciación notable o constante de la muerte celular en líneas celulares mutadas/deficientes en p53 (*TP53*).

Se siembran células A549 a una densidad de  $0,1 \times 10^6$  células/10 ml por placas de 10 cm y se incuban durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se incuban con concentraciones subóptimas de cisplatino (p. ej., de 0,5 a 4  $\mu$ g/ml) bien en combinación con 40-O-(2-hidroxiethyl)rapamicina 20 nM o bien con DMSO como vehículo de referencia durante 24 horas adicionales. Se resuelven extractos celulares correspondientes a 50  $\mu$ g de proteína total con electroforesis SDS al 8%-PAGE y se realiza un análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales de conejo producidos contra Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) y p53. En este ensayo, la presencia del inhibidor de mTOR, p. ej., 40-O-(2-hidroxiethyl)rapamicina, provoca una escisión incrementada de PARP (un marcador de la apoptosis) a concentraciones subóptimas de cisplatino (en comparación con cisplatino o el inhibidor de mTOR solos a las mismas concentraciones). Esto confirma los resultados anteriores de que, en las células A549 naturales que expresan p53 (*TP53*), la presencia del inhibidor de mTOR da como resultado niveles superiores de muerte celular a concentraciones subóptimas de cisplatino.

El estado de p53 (*TP53*) predice la sensibilidad de, p. ej., un tumor en un sujeto a una combinación de un inhibidor de mTOR con un agente citotóxico. El estado de p53 se puede determinar usando ADN, ARN o proteína obtenidos de tejido tumoral según se divulga a fin de predecir la posible capacidad de respuesta a una combinación de un inhibidor de mTOR con un agente citotóxico.



**Ejemplo 3**

Se siembran células A549 y MCF7 naturales que expresan p53 (*TP53*) a una densidad de  $0,3 \times 10^6$  y  $0,4 \times 10^6$  células/4 ml por placas de 6 cm, respectivamente, y se incuban durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se incuban con concentraciones subóptimas de cisplatino (p. ej. de 0,5 a 4 µg/ml) bien en combinación con 40-O-(2-hidroxi-etil)rapamicina 20 nM o bien con el DMSO como vehículo de referencia durante 24 horas y 30 horas adicionales, respectivamente. Se resuelven extractos celulares correspondientes a 30 µg de proteína total con electroforesis SDS al 15%-PAGE y se realiza un análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos monoclonales de ratón producidos contra p21 (Oncogene Research Products, Clon EA10, nº de catálogo OP64). En ambas líneas celulares, el cisplatino solo induce una expresión incrementada de proteína p21 de un modo dependiente de la concentración. Notablemente, la presencia del inhibidor de mTOR, p. ej. 40-O-(2-hidroxi-etil)rapamicina, atenúa la regulación al alza inducida por cisplatino de la expresión de proteína p21. En contraste, la expresión de la proteína Bax, una proteína proapoptótica regulada por p53, no está afectada ni por el agente solo ni en combinación, en este ensayo, la expresión de proteína p21 inducida por citotóxicos es inhibida por la presencia del inhibidor de mTOR. Esto proporciona una explicación de la destrucción celular/respuesta apoptótica aumentada observada con combinaciones de cisplatino e inhibidor de mTOR.

**Ejemplo 4**

Se siembran células A549 naturales que expresan p53 (*TP53*) a una densidad de  $0,1 \times 10^6$  células/5 ml por placas de 6 cm y se incuban durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se dejan sin transfectar o se transfectan transitoriamente con siARN 100 nM que se tiene como diana siARN de referencia bien de p53 humana (Número de registro: NM000546; secuencia diana: 5'-GCA TCT TAT CCG AGT GGA A-3') o bien de LacZ (Número de registro: M55068; secuencia diana: 5'-GCG GCT GCC GGA ATT TAC CTT-3'), usando Oligofectamine (Invitrogen, nº Cat 12252-011). Después de 30 horas de incubación, las células se incuban con concentraciones crecientes de cisplatino (p. ej. de 0,5 a 6 µg/ml) durante 24 horas adicionales. Se resuelven extractos celulares correspondientes a 30 µg (p21) y 50 µg (p53 y PARP) de proteína total con electroforesis SDS al 15% (p21) y al 10% (p53 y PARP)-PAGE, y se realiza un análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos monoclonales de ratón y policlonales de conejo producidos contra p21 y p53/PARP, respectivamente. El tratamiento con cisplatino de células no transfectadas o transfectadas de referencia con siARN de LacZ induce la expresión de proteína p53 y p21 de un modo dependiente de la concentración, con evidencia de escisión de PARP (un marcador de la apoptosis) a concentraciones de cisplatino superiores (de 2 a 6 µg/ml). Notablemente, la atenuación de la expresión de proteína p53 inducida por cisplatino se produce en las células transfectadas con siARN de p53, lo que se correlaciona con una atenuación drástica de la expresión de p21, la escisión de PARP y una pérdida de viabilidad celular. Los mismos efectos sobre la expresión de p53, la expresión de p21 y la escisión de PARP también se observan con otros dos siARN que tienen como diana p53 humana (secuencias diana: 5'-GGA AGA CTC CAG TGG TAA T-3' y 5'-GAT ATT GAA CAA TGG TTC A-3'). Estos datos confirman directamente que la destrucción celular/respuesta apoptótica aumentadas observadas con combinaciones de cisplatino e inhibidor de mTOR están provocadas a través de mecanismos dependientes de p53.

**Ejemplo 5**

Se siembran células A549 naturales que expresan p53 (*TP53*) a una densidad de  $0,1 \times 10^6$  células/5 ml por placas de 6 cm y se incuban durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se dejan sin transfectar o se transfectan transitoriamente con siARN 100 nM que tiene como diana siARN de referencia bien de p21 (Número de registro: NM000389; secuencia diana: 5'-GTG GAC AGC GAG CAG CTG A-3') o bien de LacZ (como anteriormente), usando Oligofectamine (Invitrogen, Nº Cat 12252-011). Después de 30 horas de incubación, las células se incuban con concentraciones crecientes de cisplatino (p. ej. de 1 a 2 µg/ml) durante 24 horas adicionales. Se resuelven extractos celulares correspondientes a 30 µg (p21) y 50 µg (PARP) de proteína total con electroforesis SDS al 15% y al 10%-PAGE, respectivamente, y se realiza un análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos monoclonales de ratón y policlonales de conejo producidos contra p21 y PARP, respectivamente. El tratamiento con cisplatino de células no transfectadas o transfectadas de referencia con siARN de LacZ induce la expresión de proteína p21 de un modo dependiente de la concentración, con evidencia de escisión de PARP (un marcador de la apoptosis). Notablemente, la atenuación de la expresión de proteína p21 inducida por cisplatino se produce en las células transfectadas con siARN de p21, lo que se correlaciona con una atenuación drástica de la escisión de PARP. Estos datos confirman directamente que la atenuación de la expresión de proteína p21 inducida por citotóxicos es responsable de la destrucción celular/respuesta apoptótica aumentadas observadas con combinaciones de cisplatino e inhibidor de mTOR.

## LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> Novartis AG

<120> Biomarcadores

<130> 4-33584A

<140>

<143>

<150> US 60/546.856

5 <151> 2004-02-23

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador

<400> 1

15 gcatcttatc cgagtgga 19

<210>

<211> 21

<212>ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia del cebador

<400> 2

gcggtgccg gaatttacct t 21

<210> 3

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador

30 <400> 3

ggaagactcc agtggaat 19

# ES 2 494 915 T3

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia del cebador

<400> 4

gatattgaac aatggtca 19

<210> 5

10 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia del cebador

15 <400> 5

gtggacagcg agcagctga 19

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de la determinación de la presencia del gen p53, *TP53*, natural, en oposición a la ausencia, la deficiencia o la supresión del gen de p53, *TP53*, o la presencia de un gen de p53, *TP53*, mutado en la muestra biológica; como un biomarcador para determinar la sensibilidad de una enfermedad proliferativa al tratamiento con un inhibidor de mTOR en combinación con un agente citotóxico.
2. Uso según la reivindicación 1, que comprende el uso del análisis del gen de p53, *TP53*, y el nivel de expresión/modificación postraduccional de p53.
- 10 3. Un método para determinar la sensibilidad de una enfermedad proliferativa en un sujeto a un tratamiento combinado con un inhibidor de mTOR y un agente citotóxico, en el que una enfermedad proliferativa en un sujeto es sensible, si se determina un gen de p53, *TP53*, natural en la muestra biológica.
4. Un método para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que la enfermedad proliferativa comprende un cáncer.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, que comprende determinar el estado genético de p53, *TP53* y/o el nivel de expresión de p53.
- 15 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la muestra se deriva de un tumor del sujeto.
7. Un método para seleccionar sujetos que sufren una enfermedad proliferativa para un tratamiento combinado con un inhibidor de mTOR y un agente citotóxico, que comprende determinar la sensibilidad de la enfermedad proliferativa al tratamiento combinado en cada sujeto mediante un método como el descrito en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, y seleccionar los sujetos que muestran estado de p53, *TP53*, natural para el tratamiento combinado.
- 20 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 o un uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el inhibidor de mTOR comprende rapamicina o un derivado de rapamicina.
9. Un método para el uso según la reivindicación 8, en el que el derivado de rapamicina comprende 40-O-(2-hidroxi-etil)rapamicina, 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina o 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina.
- 25 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 o un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 8 o 9, en el que el agente citotóxico se selecciona de un antimetabolito antineoplástico, un compuesto de platino, un agente alquilante, un inhibidor de topoisomerasa I o II, un agente activo para los microtúbulos e irradiación.
- 30 11. Un inhibidor de mTOR para el uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto que lo necesite, en el que un inhibidor de mTOR se ha de administrar en combinación con un agente citotóxico a un sujeto, cuya muestra biológica se está determinando que muestra estado de p53, *TP53*, natural por cualquier medio técnico basado en el análisis de ADN con respecto a cambios genéticos y epigenéticos, exploración de ADN con respecto a amplificación, metilación, polimorfismos, mutaciones nucleotídicas, supresiones, inversiones y/o traslaciones nucleotídicas y pérdida de heterocigotidad, basado en la expresión de ARN o basado en la expresión/modificaciones de proteínas.
- 35 12. El inhibidor de mTOR para el uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto que lo necesite según la reivindicación 11, en el que el inhibidor de mTOR es rapamicina, 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina o 40-O-(2-hidroxi-etil)rapamicina y el agente citotóxico es gemcitabina o cisplatino.