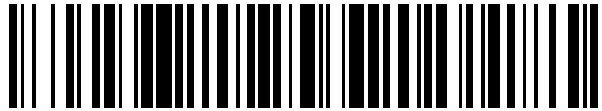


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 972**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07D 413/04 (2006.01)

C07D 413/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2012 PCT/EP2012/055522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12130887**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012 E 12710755 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2691533**

54 Título: **Uso de fosfo-Akt como un biomarcador de la respuesta a fármacos**

30 Prioridad:

29.03.2011 EP 11160275

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**BASILEA PHARMACEUTICA AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 487
4005 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BACHMANN, FELIX y
LANE, HEIDI, ALEXANDRA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 627 972 T3

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

DESCRIPCIÓN

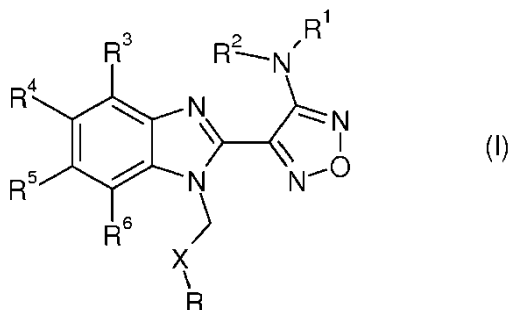
Uso de fosfo-Akt como un biomarcador de la respuesta a fármacos

La presente invención se refiere al uso de fosfo-Akt como un biomarcador para predecir la respuesta de una enfermedad tal como una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, a un compuesto de fórmula general I tal como 3-(4-{1-[2-(4-amino-fenil)-2-oxo-etil]-1H-benzimidazol-2-il}-furazan-3-ilamino)propionitrilo (BAL27862). En otros aspectos se refiere a métodos y kits, así como a métodos de tratamiento que implican el uso del biomarcador.

Los microtúbulos son uno de los componentes del citoesqueleto de la célula y se componen de heterodímeros de tubulina alfa y beta. Los agentes que fijan como objetivo los microtúbulos se encuentran entre los agentes quimioterapéuticos citotóxicos más eficaces que tienen un amplio espectro de actividad. Agentes desestabilizantes de microtúbulos (p. ej., los alcaloides de la vinca tales como vincristina, vinblastina y vinorelbina) se utilizan, p. ej., en el tratamiento de varios tipos de tumores malignos hematológicos tales como leucemia linfoblástica y linfoma, así como tumores sólidos tales como el cáncer de pulmón. Agentes estabilizadores de los microtúbulos (p. ej., los taxanos tales como paclitaxel, docetaxel) se utilizan, por ejemplo, en el tratamiento de tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, de pulmón y cáncer de próstata.

Sin embargo puede producirse una resistencia a estos agentes fijadores como objetivo de microtúbulos conocidos. La resistencia puede ser inherente o puede ser adquirida después de la exposición a estos agentes. Tal resistencia, por lo tanto, impacta sobre las tasas de supervivencia de los pacientes, así como opciones de regímenes de tratamiento. Se han identificado varios mecanismos potenciales de resistencia, e incluyen defectos en las dianas de microtúbulos tales como concentraciones elevadas de beta-tubulina subtipo III y mutaciones adquiridas en beta-tubulina subtipo I que se sabe reducen la unión de taxano. Además, se ha sugerido que defectos en otras proteínas celulares se asocian con la resistencia a determinados agentes que fijan como objetivo microtúbulos tales como la sobre-expresión de la bomba de eflujo de glicoproteína P (P-gp, también conocida como proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 o MDR1). Este tipo de factores puede entonces ser utilizado como biomarcadores de resistencia a estos agentes que fijan como objetivo microtúbulos convencionales.

Una clase de agentes desestabilizantes de microtúbulos descubierta relativamente reciente son compuestos abarcados por la fórmula dada a continuación:



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxi-alcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa un grupo C=Y, en donde Y representa oxígeno o nitrógeno sustituido con hidroxilo o alcoxi inferior;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

o en donde

R representa fenilo o piridinilo

5 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

10 y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa oxígeno;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

15 R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior; o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

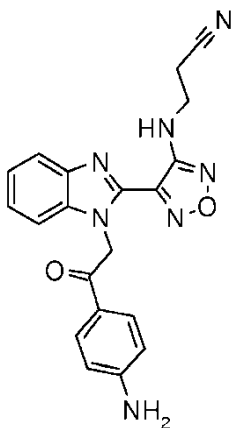
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

20 Estos compuestos se describen en el documento WO2004/103994 A1. En dicho documento, estos compuestos han demostrado detener la proliferación de células tumorales e inducir la apoptosis.

La síntesis de compuestos de fórmula I se describe en el documento WO2004/103994 A1, en general, en las páginas 29-35, y en concreto en las páginas 39-55. Se pueden preparar tal como se describe o por un método análogo a los procesos descritos en el mismo.

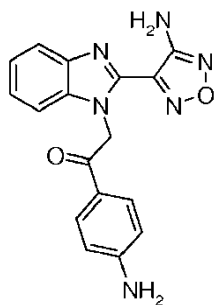
25 Un compuesto que cae dentro de esta clase, conocido como BAL27862, y mostrado en el documento WO2004/103994 A1 como ejemplo 58, tiene la estructura química y el nombre dado a continuación:



Nombre químico:

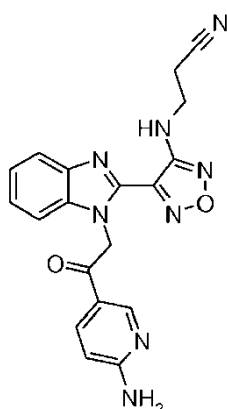
3-(4-{1-[2-(4-amino-fenil)-2-oxo-etil]-1H-benzimidazol-2-yl}-furazan-3-ilamino)-propionitrilo, o en esta memoria como Compuesto A.

30 Otros compuestos ejemplificados en el documento WO2004/103994 A1 como ejemplos 50 y 79, respectivamente, tienen las estructuras y nombres químicos que se indican a continuación:



Nombre químico: 2-[2-(4-amino-furazan-3-il)-benzoimidazol-1-il]-1-(4-amino-fenil)-etanona; o en esta memoria como Compuesto B

y



5

Nombre químico: 3-(4-{1-[2-(6-amino-piridin-3-il)-2-oxo-etil]-1H-benzoimidazol-2-il}-furazan-3-ilamino)-propionitrilo; o en esta memoria como Compuesto C.

BAL27862 tiene actividad a lo largo de un amplio panel de modelos experimentales de xenoinjertos de tumores sólidos. Además de ello, la actividad se mantiene incluso en contra de modelos de tumores que se seleccionan en cuanto a la resistencia a agentes que fijan como objetivo microtúbulos convencionales (incluyendo los desestabilizadores de microtúbulos de alcaloides de la vinca y los estabilizadores de microtúbulos paclitaxel y epotilona B). La actividad de BAL27862 no se ve afectada por la sobre expresión de la bomba de P-gp en ningún modelo sometido a ensayo *in vitro*, ni en xenoinjertos de tumores mamarios humanos. Adicionalmente, BAL27862 retuvo su actividad a pesar de las concentraciones elevadas de beta-tubulina subtipo III y mutaciones en tubulina subtipo I (véase el póster "Actividad *in vitro* del nuevo agente activo tubulina BAL27862 en MDR1(+) y MDR1(-) de variantes de cáncer de mama y de ovario humano, seleccionadas en cuanto a la resistencia a taxanos", presentado en la 101ª Reunión Anual de 2010).

Por lo tanto, la actividad de BAL27862 no se ve afectada por un cierto número de factores que confieren resistencia a los agentes que fijan como objetivo microtúbulos convencionales.

Además de ello, se sabe que los compuestos de fórmula general I tienen un efecto diferente en el fenotipo de las células en comparación con otros agentes que fijan como objetivo microtúbulos, incluyendo otros desestabilizadores de microtúbulos (véase el póster "BAL27862: Un Nuevo Agente Anticáncer que Disocia Microtúbulos y Crea un Fenotipo Celular Distinto", presentado en el Simposio EORT-NCI-AACR de 2009). La presente solicitud también muestra que el tratamiento con un compuesto de fórmula general I induce un fenotipo de microtúbulos consistente en líneas celulares tumorales derivadas de una diversidad de órganos, por ejemplo, pulmón, cuello uterino y mama, como se ve en la Figura 1. La tinción de los microtúbulos en estas células con un anticuerpo anti-tubulina alfa demuestra que en lugar de las fibras del huso mitótico de células no tratadas, solamente son visibles las estructuras en forma de puntos en las células tratadas. Este mismo efecto se muestra también utilizando compuestos C y B en las Figuras 2A y 2B, respectivamente, en la línea celular de cáncer de pulmón A549. Sin embargo, es muy distinto del observado con los agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos vinblastina, colchicina, paclitaxel y nocodazol tal como se ve en las Figuras 3B, 3C, 3D y 4, respectivamente. Los microtúbulos se tiñeron con un anticuerpo anti-tubulina alfa y las células se vieron en un aumento de 1000 x (Figuras 3, 4). Para las células tratadas con BAL27862, son visibles múltiples estructuras en forma de puntos, mientras que, en marcado contraste, los otros fármacos convencionales producen estructuras filamentosas de microtúbulos o estructuras agregadas de

microtúbulos densas. Estas diferencias a nivel fenotípico, en dosis de compuestos considerados óptima en términos de efecto antiproliferativo indican una diferencia en el modo de acción a nivel molecular.

Además, se sabe que BAL27862 provoca un fenotipo dominante de microtúbulos en presencia de los otros agentes que fijan como objetivo microtúbulos (véase también el póster "BAL27862: Un Nuevo Agente contra el Cáncer que Disocia Microtúbulos y Crea un Fenotipo Celular Distinto"). La presente solicitud también muestra que el tratamiento con vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol por sí solo inducía los fenotipos de microtúbulos característicos de estos agentes (Figuras 5A, 5D, 5G, 6C-6F, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento de combinación con BAL27862 durante las últimas 4 horas dio lugar a la interrupción de estos fenotipos; a pesar de la presencia continua de vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol (Figuras 5B, 5E, 5H, 6G-6J, respectivamente). En contraste, el tratamiento primero con BAL27862 y posteriormente durante 4 horas en combinación con vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol no tuvo impacto alguno en la generación del fenotipo compatible con el tratamiento con BAL27862 (Figuras 5C, 5F, 5I, 6K-6N, respectivamente).

Todos estos datos demuestran que BAL27862 afecta a la biología de los microtúbulos de una manera diferente que los agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos.

En *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, págs. 5191-5194 (2009) se describen derivados de 4-(bencimidazol-2-il)-1,2,5-oxadiazol-3-ilamina, que tienen en el nitrógeno de la posición 1 del resto de bencimidazolilo un sustituyente de tipo alquilo, fenilo o (fenilo sustituido con ciano o metoxi)alquilo, como inhibidores de la cinasa p706.

En *Laboratory Investigation* 90, págs. 1406-1414 (2010) se describe la ruta de PI3K/Akt/mTOR como un sistema regulador de la función y crecimiento celular y su posible función en el cáncer de vejiga.

En el documento WO 2010/135671 se describe que la Akt fosforilada en S473 puede ser un indicador para la quimioterapia basada en taxano.

Por lo tanto, a partir de la información acerca de los agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos, las predicciones no pueden hacerse respecto a si, o cómo, genes particulares están implicados en la acción de los compuestos de fórmula general I.

Un objeto de la presente invención es identificar factores que estén asociados con la respuesta a compuestos de fórmula I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, por ejemplo, para identificar los factores asociados con la resistencia a los compuestos de fórmula general I, en particular BAL27862 o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se define más adelante.

Sorprendentemente, se ha encontrado que fosfo-Akt se puede utilizar como un biomarcador de la respuesta al tratamiento con un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se define más adelante.

En una realización preferida de la invención, concentraciones relativamente altas de fosfo-Akt en una muestra de tumor se asocian con una resistencia inherente a BAL27862.

Hasta la fecha, la familia Akt está constituida por tres genes conocidos, también denominados isoformas, Akt1, Akt2 y Akt3. Estos genes presentan una homología en los ácidos nucleicos, así como también en la secuencia polipeptídica. Los genes Akt también son muy conocidos por varios nombres alternativos, lo que refleja su descubrimiento por diferentes grupos. El nombre Akt surgió debido a su descubrimiento como el homólogo humano del proto-oncogén del retrovirus transformante AKT8. También se conoce a Akt como proteína cinasa B o RAC (Relacionado con las cinasas A y C), ya que estas proteínas Akt están muy relacionadas con la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC). Por lo tanto, se conoce a la familia Akt por los siguientes sinónimos c-AKT; proto-oncogén c-Akt; proteína cinasa B; PKB; RAC; serina/treonina-proteína cinasa RAC; proteína cinasa RAC y RAC-PK. Akt1, el primer gen descubierto, también se conoce como c-AKT1; PKB; PKB-alfa; PRKBA; RAC; serina/treonina-proteína cinasa RAC-alfa; RAC-ALFA; RAC-PK-alfa y MGC99656. Akt2 también se conoce como proteína cinasa Akt-2; proteína cinasa B beta; PKBBETA; PRKBB; RAC-BETA; serina/treonina-proteína cinasa RAC-beta y RAC-PK-beta. Akt3 también se conoce como PKB-gamma; PKBG; PRKGB; serina/treonina-proteína cinasa RAC-gamma; RAC-gamma; RAC-PK-gamma; DKFZP434N0250 y SKT-2. Para algunos de estos genes también se han detectado variantes alternativas del corte y empalme del transcrito. Se han descrito variantes alternativas del corte y empalme del transcrito para Akt3, concretamente la isoformas 1 de la serina/treonina-proteína cinasa RAC-gamma y la isoforma 2 de la serina/treonina-proteína cinasa RAC-gamma, que difieren en la longitud. La designación Akt se utilizará en esta memoria para englobar las tres proteínas relacionadas Akt1, Akt2, Akt3 y todos los sinónimos enumerados anteriormente, incluidas las isoformas.

Se puede modificar Akt después de la traducción, incluida la fosforilación en uno o más sitios. Por ejemplo, se sabe que es posible fosforilar Akt1 en Ser-124, Thr-308, Thr-450 y Ser-473. Se puede fosforilar de manera simultánea

más de un sitio. Se ha identificado especialmente la regulación de la función de Akt respecto a la fosforilación de dos sitios: una treonina: T308 (Akt1), T309 (Akt 2), T305 (Akt3) y una serina: S473 (Akt1), S474 (Akt2), S472 (Akt3).

5 Se cree que la cinasa 1 que depende del fosfoinositido (PKD1) fosforila la treonina 308, mientras que se ha identificado recientemente el Complejo 2 mTOR (mTORC2) como PDK2, ya que se cree que fosforila la serina 473 de Akt1.

10 Tal como se utiliza en esta memoria, fosfo-Akt se referirá a Akt que ha sido fosforilada en uno o más residuos, siempre que para Akt1, Akt2 y Akt3 la designación fosfo-Akt se utilice para indicar fosforilación en un sitio que no sea T308, T309 o T305, respectivamente. Para clarificar esto aún más, la fosfo-Akt podrá estar o no estar fosforilada en T308, T309 o T305 para Akt1, Akt2 y Akt3, respectivamente, pero la designación fosfo-Akt indica fosforilación en sitios diferentes de estos. La fosfo-Akt también se podrá modificar opcionalmente después de la traducción de alguna manera que no sea fosforilación.

Fosfo-Akt se referirá a Akt que se ha fosforilado en el siguiente residuo de serina:

para Akt1: S473;

para Akt2: S474; y

15 para Akt3: S472.

Por lo tanto, esta realización no engloba la Akt3 codificada por la isoforma 2 de la serina/treonina-proteína cinasa RAC-gamma, ya que no tiene una serina 472.

Se pueden consultar las secuencias proteicas que codifican Akt1, Akt2 y Akt3 humanas con los números de acceso del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés)

20 Akt1: NP_005154.2, véase la SEQ ID No. 1 (véase también NP_001014431 y NP_001014432);

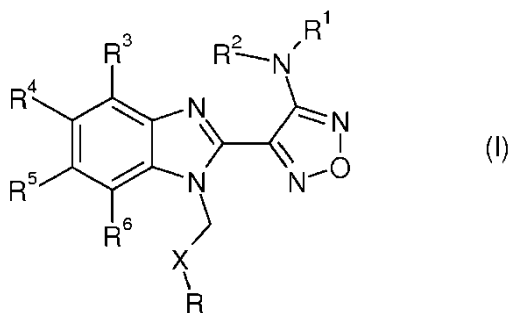
Akt2; NP_001617.1, véase la SEQ ID No. 2 y

Akt3: NP_005456.1: isoforma 1 de la serina/treonina-proteína cinasa RAC-gamma, véase la SEQ ID No. 3.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de fosfo-Akt como un biomarcador para predecir la respuesta a un compuesto,

25 en el que fosfo-Akt es Akt tal como se define en la reivindicación 1

en el que el compuesto es un compuesto de fórmula general I,



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo

30 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, acloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenilalcoxi inferior, alquil inferior-carbonilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

35 y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno; X representa un grupo C=Y, en donde Y representa oxígeno o nitrógeno sustituido con hidroxialcoxi inferior;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior; o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

o en donde

R representa fenilo o piridinilo

5 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

10 y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa oxígeno;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

15 R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, tal como se definen en la reivindicación 1;

20 y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

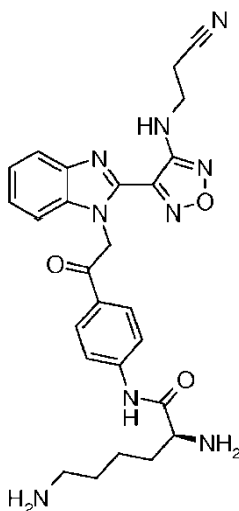
La respuesta es tal como se define en la reivindicación 1. Preferiblemente, la respuesta puede ser para el tratamiento, es decir, para el tratamiento con el compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

25 El biomarcador fosfo-Akt se mide *ex vivo* en una muestra o muestras tomadas del cuerpo humano o animal, tomadas preferentemente del organismo humano. La muestra o muestras se pre-obtienen del cuerpo humano o animal, preferentemente se pre-obtienen del cuerpo humano.

En una realización preferida, la invención se refiere al uso de fosfo-Akt como un biomarcador para predecir la resistencia de la enfermedad en un sujeto a un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos como se define anteriormente.

30 El derivado farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en una sal, solvato, pro-fármaco y sal de un pro-fármaco de un compuesto de fórmula general I. Los pro-fármacos son ésteres y amidas de aminoácidos de origen natural, pequeños péptidos o hidroxiaácidos pegilados. Más preferiblemente, el pro-fármaco es una amida formada a partir de un grupo amino presente en el grupo R del compuesto de fórmula general I y el grupo carboxi de glicina, alanina o lisina.

35 De manera particularmente preferible el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente una sal hidrocioruro del mismo, lo más preferiblemente una sal dihidrocioruro del mismo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para predecir la respuesta de un cáncer en un sujeto a un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se define anteriormente, que comprende las etapas de:

- 5 a) medir *ex vivo* una concentración de fosfo-Akt tal como se ha definido anteriormente en una muestra pre-obtenida del sujeto para obtener un valor o valores que representan esta concentración; y
- b) comparar el valor o los valores de la etapa a) con un valor estándar o un conjunto de valores estándar de los sujetos con el mismo histotipo de cáncer.

Además, preferiblemente la respuesta que se prevé es la resistencia.

10 La medición de una concentración o concentraciones de fosfo-Akt se lleva a cabo *ex vivo* en una muestra pre-obtenida del sujeto. Pre-obtenidas se refiere al hecho de que la muestra se obtiene antes de someterla a cualquier método que implique la medición de la concentración del biomarcador, y pre-obtenidas no ha de entenderse como en relación con el tratamiento.

En una realización preferida, una mayor concentración de fosfo-Akt en la muestra del sujeto con relación al valor estándar o conjunto de valores estándar predice resistencia.

15 La enfermedad es cáncer. De manera especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer colorrectal (es decir, incluyendo el cáncer de colon y cáncer rectal), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer neuroendocrino, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, tumores malignos hematológicos, melanoma y sarcomas. De manera más especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer
20 cervical, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y melanoma. De manera especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y melanoma.

En esta memoria también se describe un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende medir una concentración de fosfo-Akt tal como se ha definido anteriormente en una muestra del sujeto para obtener un valor o valores que representan esta concentración, y tratar el sujeto con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente
25 aceptable del mismo tal como se define anteriormente, si la concentración de fosfo-Akt en dicha muestra no es mayor que un valor estándar o un conjunto de valores estándar.

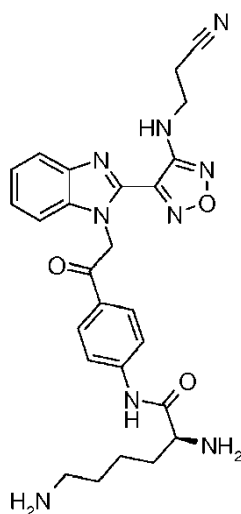
Se puede utilizar la fosfo-Akt tal como se ha definido anteriormente en el tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, en donde una concentración de fosfo-Akt en una muestra de un sujeto se
30 mide para obtener un valor o valores que representan esta concentración, y el sujeto es tratado con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo como se define anteriormente, si la concentración de fosfo-Akt no es mayor que un valor estándar o un conjunto de valores estándar.

La medición de una concentración de fosfo-Akt se lleva a cabo *ex vivo* en una muestra pre-obtenida del sujeto.

En esta memoria también se describe un método de tratar una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, disminuyendo primero una concentración de fosfo-Akt tal como se ha definido anteriormente en un sujeto que tiene una muestra con una mayor concentración de fosfo-Akt en comparación con una
35 concentración estándar o un conjunto de concentraciones estándar y, a continuación, tratar al sujeto con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo como se define anteriormente.

40 En aún otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit para predecir la respuesta a un compuesto de fórmula I general o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente, que comprende los reactivos necesarios para medir la concentración de fosfo-Akt tal como se ha definido anteriormente en una muestra. El kit también comprende un módulo de comparador que comprende un valor estándar o un conjunto de valores estándar con los que la concentración de fosfo-Akt en la muestra se compara.

45 El kit también comprende un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido anteriormente. En una realización especialmente preferida, el kit comprende un compuesto de la siguiente fórmula o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo



Nombre químico: [4-(2-{2-[4-(2-ciano-etilamino)-furazan-3-il]-benzoimidazol-1-il}-acetil)-fenil]-amida del ácido S-2,6-diamino-hexanoico

En una realización particularmente preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal dihidrocloruro.

- 5 Los reactivos en el kit comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para fosfo-Akt, y un reactivo detector, en donde el reactivo de captura es un anticuerpo. También preferiblemente, la enfermedad se predice para ser resistente al tratamiento con dicho compuesto cuando fosfo-Akt es mayor en relación con un valor estándar o un conjunto de valores estándar. En una realización preferida, el módulo de comparador está incluido en las instrucciones de uso del kit. En otra realización preferida, el módulo de comparador está en forma de un dispositivo de visualización.

Realizaciones de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas. La invención, sin embargo, no ha de entenderse limitada a estas formas de realización.

Breve Descripción de las Figuras

- 15 Figura 1: Muestra el tratamiento de líneas celulares de tumores humanos de diferentes histotipos con BAL27862 50 nM. Los microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M fueron teñidos después de 24 horas de tratamiento con BAL27862 50 nM o vehículo de control

Fig. 1A y 1B: células de NSCLC A549;
 Fig. 1C y 1D: células de cáncer cervical HeLa;
 Fig. 1E y 1F: células de cáncer de mama SKBR3
 Tratamiento con control de vehículo: Figuras 1A, 1C y 1E,
 tratamiento con BAL27862: Figuras 1B, 1D y 1F.

- Figura 2: Muestra el tratamiento de células de NSCLC A549 con los Compuestos B y C. Los microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M de NSCLC A549 fueron teñidos después de 24 horas de tratamiento con 80 nM o 20 nM de los Compuestos B y C, respectivamente. La barra de escala blanca representa 10 micrómetros.

- 25 Fig. 2A: tratamiento con 20 nM de compuesto C
 Fig. 2B: tratamiento con 80 nM de compuesto B

- Figura 3: Muestra una comparación del tratamiento de células con BAL27862 en comparación con los agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M de NSCLC A549 fueron teñidos después de 24 horas de tratamiento con 50 nM de A: BAL27862; B: vinblastina; C: colchicina; D: paclitaxel. Pilas de imágenes tomadas cada 1 μ m, se procesaron utilizando el software ImageJ.

- Figura 4: Muestra una comparación del tratamiento de células de NSCLC A549 con BAL27862 en comparación con nocodazol. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M fueron teñidos después de 24 h de tratamiento con diversas concentraciones de nocodazol (B, C y D) y BAL27862 (E, F y G). A: control, B: Nocodazol 50 nM, C: Nocodazol 100 nM, D: Nocodazol 200 nM, E: BAL27862 20 nM; F: BAL27862 30 nM y G: BAL27862 50 nM. La barra de escala blanca representa 10 micrómetros. Se muestran imágenes representativas de los fenotipos de microtúbulos observados.

Figura 5: Muestra una combinación de tratamiento con BAL27862 y agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M de NSCLC A549 fueron teñidos después del tratamiento durante los tiempos indicados más adelante. Se utilizaron BAL27862 50 nM, vinblastina 50 nM, colchicina 50 nM y paclitaxel 25 nM. La barra de escala blanca representa 10 micrómetros.

- 5 Fig. 5A: Tratamiento con vinblastina durante 24 horas;
 Fig. 5B: Tratamiento con vinblastina durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862;
 Fig. 5C: Tratamiento con BAL27862 durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales vinblastina;
 Fig. 5D: Tratamiento con colchicina durante 24 horas;
 Fig. 5E: Tratamiento con colchicina durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862;
 10 Fig. 5F: Tratamiento con BAL27862 durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales colchicina;
 Fig. 5G: Tratamiento con paclitaxel durante 24 horas;
 Fig. 5H: Tratamiento con paclitaxel durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862;
 Fig. 5I: Tratamiento con BAL27862 durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales paclitaxel.

15 Figura 6: Muestra una combinación de tratamiento con BAL27862 y nocodazol. Microtúbulos de células mitóticas o detenidas G2/M de NSCLC A549 fueron teñidos después del tratamiento durante los tiempos indicados más adelante. Se utilizaron BAL27862 25 nM y nocodazol a las concentraciones indicadas a continuación. La barra de escala blanca representa 10 micrómetros.

- Fig. 6A: Tratamiento con control durante 24 horas;
 Fig. 6B: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas;
 20 Fig. 6C: Tratamiento con nocodazol 50 nM durante 24 horas;
 Fig. 6D: Tratamiento con nocodazol 100 nM durante 24 horas;
 Fig. 6E: Tratamiento con nocodazol 150 nM durante 24 horas;
 Fig. 6F: Tratamiento con nocodazol 200 nM durante 24 horas;
 Fig. 6G: Tratamiento con nocodazol 50 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862 25 nM;
 25 Fig. 6H: Tratamiento con nocodazol 100 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862 25 nM;
 Fig. 6I: Tratamiento con nocodazol 150 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862 25 nM;
 Fig. 6J: Tratamiento con nocodazol 200 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales BAL27862 25 nM;
 Fig. 6K: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales nocodazol 50 nM;
 Fig. 6L: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales nocodazol 100 nM;
 30 Fig. 6M: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales nocodazol 150 nM;
 Fig. 6N: Tratamiento con BAL27862 25 nM durante 24 horas incluyendo las 4 horas finales nocodazol 200 nM;

Figura 7: muestra extractos proteicos preparados a partir de tumores derivados de pacientes con cáncer gástrico (Fig. 7A), cáncer de pulmón (Fig. 7B), cáncer colorrectal (Fig. 7C) y melanoma (Fig. 7D) obtenidos a partir de ratones sin pelo con un xenoinjerto subcutáneo y analizados por inmunotransferencia para determinar la expresión de fosfo-Akt y Akt, donde se incluye actina como un control de carga. Se analizaron tres tumores independientes en cada caso (1-3). La resistencia y sensibilidad de las células tumorales a BAL27862, paclitaxel y vinblastina utilizando un ensayo de brote de colonias *ex vivo* tal como se define en la Tabla 1.

Figura 8: muestra que la concentración de fosfo-Akt en las células tumorales está elevada en un modelo de tumor gástrico de xenoinjerto derivado de un paciente definido como resistente a BAL27862 mediante análisis de brote de colonias *ex vivo*. Se prepararon los xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (mantenidos en ratones sin pelo), se fijaron y se tiñeron para determinar la expresión de la proteína fosfo-Akt utilizando inmunohistoquímica. La resistencia y sensibilidad a BAL27862, paclitaxel y vinblastina de las células tumorales utilizando un ensayo de brote de colonias *ex vivo* es tal como se define en la Tabla 1.

Figura 9: muestra la secuencia proteica de Akt1 (serina/treonina-proteína cinasa RAC-alfa) [Homo sapiens] (SEQ ID No. 1)

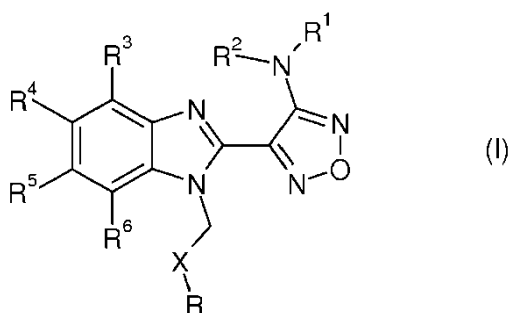
Figura 10: muestra la secuencia proteica de Akt2 (serina/treonina-proteína cinasa RAC-beta) [Homo sapiens] (SEQ ID No. 2)

Figura 11: muestra la secuencia proteica de Akt3 (isoforma 1 de la serina/treonina-proteína cinasa RAC-gamma) [Homo sapiens] (SEQ ID No. 3)

50 **Descripción Detallada**

Compuestos de fórmula I

Los compuestos están representados por la fórmula general I:



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo

5 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi; y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa un grupo C=Y, en donde Y representa oxígeno o nitrógeno sustituido con hidroxialcoxi inferior;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

15 o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

o en donde

R representa fenilo o piridinilo,

20 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxi;

25 y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa oxígeno;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

30 R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxi;

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos;

y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

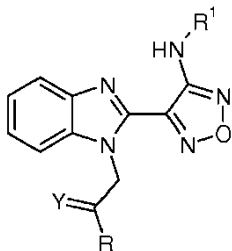
35 Heterociclilo designa preferiblemente un anillo saturado, parcialmente saturado o insaturado, mono- o bi-cíclico que contiene 4-10 átomos que comprenden uno, dos o tres heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, que puede estar, a menos que se especifique lo contrario, enlazado a carbono o nitrógeno, en el que un átomo de nitrógeno del anillo puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo inferior, amino-alquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior y acilo, y un átomo de carbono del anillo puede estar sustituido con alquilo inferior, amino-alquilo inferior, arilo, arilo-alquilo inferior, heteroarilo, alcoxi inferior, hidroxialcoxi u oxo. Ejemplos de heterociclilo son pirrolidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, dioxolanilo y tetrahidropiranilo.

Acilo designa, por ejemplo, alquilcarbonilo, ciclohexilcarbonilo, arilcarbonilo, aril-alquil inferior-carbonilo o heteroarilcarbonilo. Acilo inferior es preferiblemente alquil inferior-carbonilo, en particular propionilo o acetilo.

45 Preferiblemente, el compuesto de fórmula general I se define como en donde R¹ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, acetilo, CH₂CH₂CN y CH₂CH₂CH₂OH.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula general I se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 4-(1-fenacil-1H-bencimidazol-2-il)-furazan-3-ilamina,
 4-[1-(4-bromofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina oxima,
 N-{4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il}-acetamida,
 4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(2-cianoetil)-amina,
 4-[1-(4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(3-hidroxiopropil)-amina,
 4-[1-(3-amino-4-clorofenacil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina
 4-[1-(3-metoxi-4-metoximetoxi-fenacilo)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina,
 y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 10 En otra realización preferida, el compuesto de fórmula general I es:

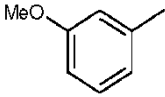
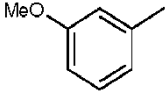
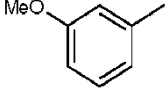
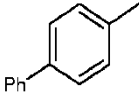
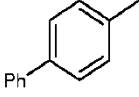
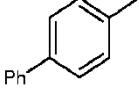
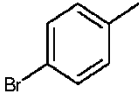
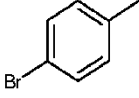
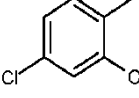
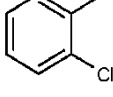
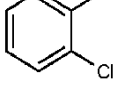
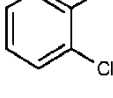


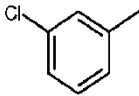
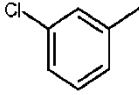
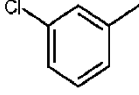
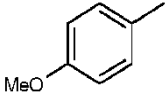
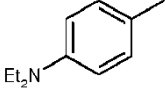
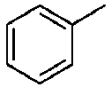
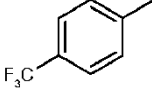
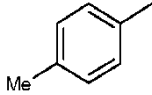
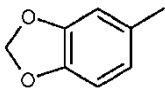
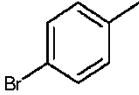
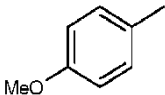
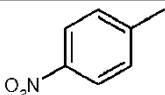
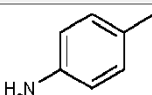
en donde

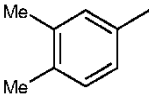
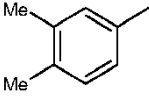
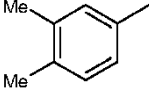
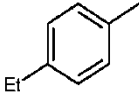
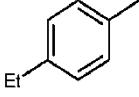
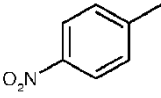
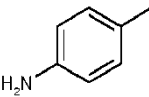

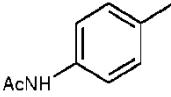
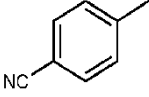
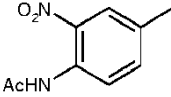
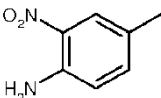
R, Y y R¹ se definen como sigue:

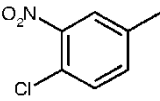
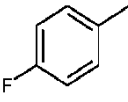
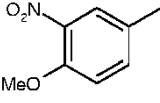
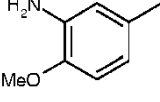
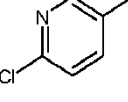
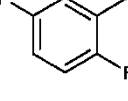

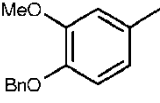
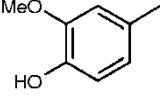
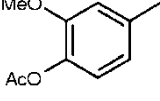
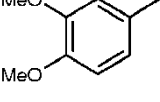
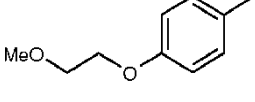
R	Y	R ¹
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOH	H
	NOMe	H

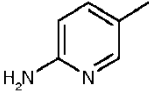
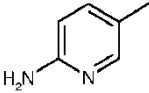
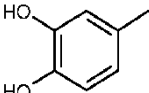
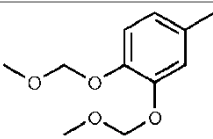
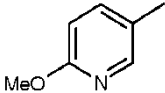
ES 2 627 972 T3

R	Y	R ¹
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOMe	H
	O	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H

R	Y	R ¹
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	NOMe	H
	O	H
	O	Ac
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H

R	Y	R ¹
	O	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H

R	Y	R ¹
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H

R	Y	R ¹
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN

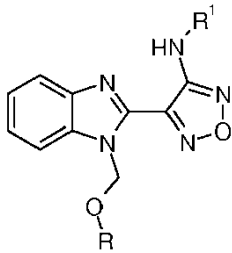
o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

Aún en una realización preferida, el compuesto de fórmula general I se selecciona del grupo que consiste en:

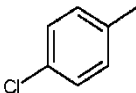
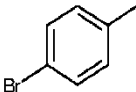
4-(1-fenoximetil-1H-bencimidazol-2-il)-furazan-3-ilamina,

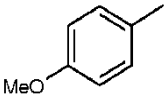
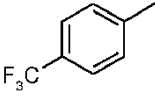
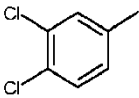
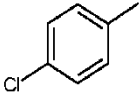
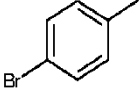
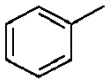
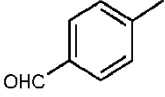
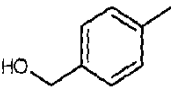
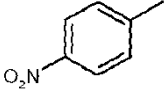
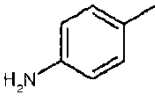
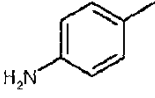
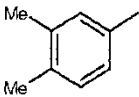
4-[1-(4-fluorofenoximetil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-ilamina,

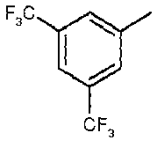
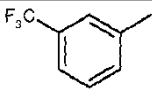
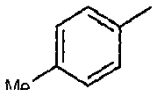
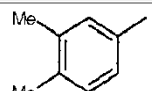
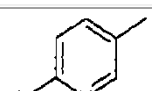
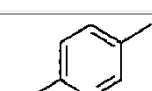
- 5 4-[1-(3,4-dimetilfenoximetil)-1H-bencimidazol-2-il]-furazan-3-il-N-(2-cianoetil)-amina,
y compuestos representados por la fórmula:



en donde R y R¹ son como se definen a continuación

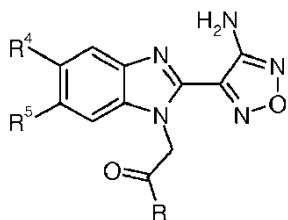
R	R ¹
	H
	H

R	R ¹
	H
	H
	H
	CH ₂ CH ₂ CN
	CH ₂ CH ₂ CN
	CH ₂ CH ₂ CN
	H
	H
	H
	H
	H
	H

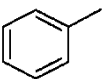
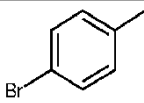
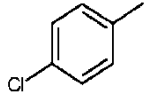
R	R ¹
	H
	H
	CH ₂ CH ₂ CN
	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
	H
	H

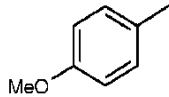
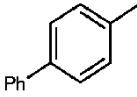
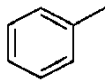
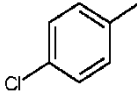
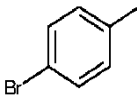
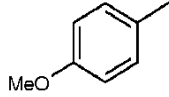
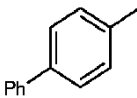
o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En aún otra realización preferida, el compuesto de fórmula general I es:



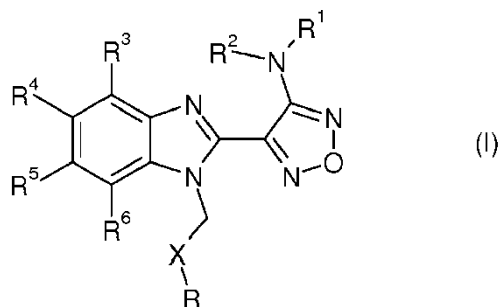
en donde R, R⁴ y R⁵ son como se definen a continuación

R	R ⁴	R ⁵
	Me	Me
	Me	Me
	Me	Me

R	R ⁴	R ⁵
	Me	Me
	Me	Me
	OMe	OMe
	OMe	OMe
	OMe	OMe
	OMe	OMe
	OMe	OMe

o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

Más preferiblemente, el compuesto es un compuesto de fórmula general I



en donde

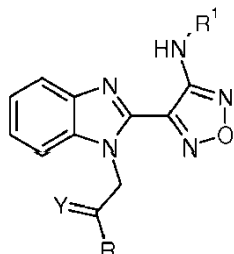
5 R representa fenilo o piridinilo,

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo inferior, alcoxi inferior, amino, acetilamino, halógeno y nitro;
y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con amino o halógeno;

10 X representa un grupo C=O;
R¹ representa hidrógeno o ciano- alquilo inferior;
R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno;
y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos,

y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

De manera especialmente preferida, el compuesto está representado por la siguiente fórmula

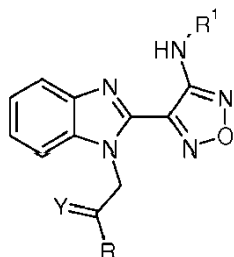


5 en donde R, Y y R¹ se definen como sigue:

R	Y	R ¹
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN

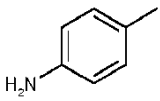
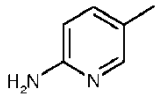
o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

De manera más especialmente preferida, el compuesto está representado por la siguiente fórmula



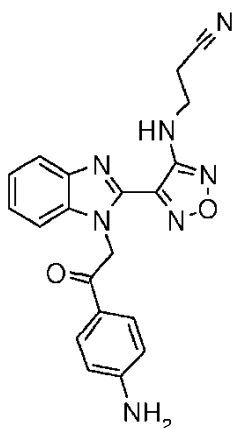
en donde R, Y y R¹ se definen como sigue:

R	Y	R ¹
	O	CH ₂ CH ₂ CN

R	Y	R1
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN

o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

De manera particularmente preferida, el compuesto de fórmula general es



o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 5 El término derivado o derivados en la frase "derivado farmacéuticamente aceptable" o "derivados farmacéuticamente aceptables" de los compuestos de fórmula general I se refiere a sales, solvatos y complejos de los mismos y a solvatos y complejos de sales de los mismos, así como a pro-fármacos y también sales de pro-fármacos de los mismos.

- 10 En una realización más preferida, se refiere a sales y pro-fármacos, así como a sales de profármacos de los mismos.

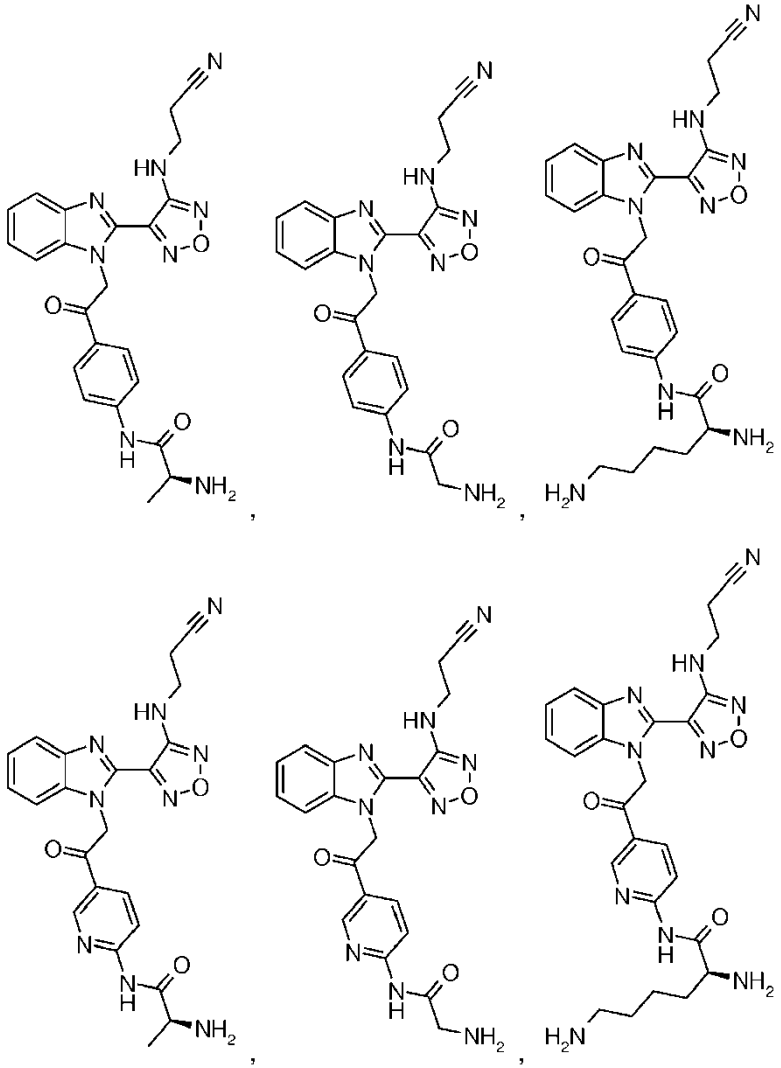
- Las sales son preferiblemente sales por adición de ácidos. Las sales se forman, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de compuestos de fórmula (I) con un átomo de nitrógeno de carácter básico, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos halogenados tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, los ácidos carboxílico, fosfónico, sulfónico o sulfámico, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adípico, pimélico ácido, ácido subérico, ácido azelaico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, aminoácidos tales como ácido glutámico o ácido aspártico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido adamantanocarboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido cinámico, ácido metano- o etano-sulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, ácido 2-, 3- ó 4-metilbencenosulfónico, ácido metilsulfúrico, ácido etilsulfúrico, ácido dodecilsulfúrico, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-, N-etil- o N-propil-sulfámico, u otros ácidos protónicos orgánicos tales como ácido ascórbico.

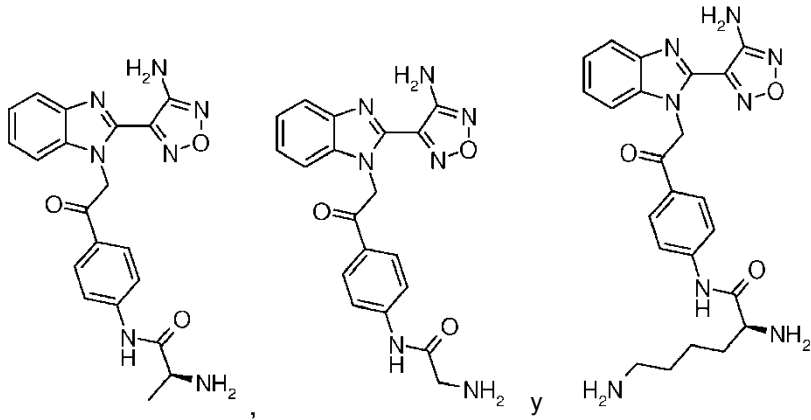
- 25 El compuesto de fórmula I se puede administrar en forma de un pro-fármaco que se descompone en el cuerpo humano o animal para dar el compuesto de la fórmula I. Los ejemplos de pro-fármacos incluyen ésteres y amidas hidrolizables in vivo de un compuesto de la fórmula I. Pro-fármacos considerados son ésteres y amidas de aminoácidos que se producen de forma natural y ésteres o amidas de péptidos pequeños, en particular péptidos pequeños que consisten en hasta cinco, preferiblemente en dos o tres aminoácidos, así como ésteres y amidas de hidroxiaácidos pegilados, preferiblemente ácido hidroxil-acético y ácido láctico. Ésteres de pro-fármacos se forman a partir de la función ácido del aminoácido o el extremo C del péptido y grupo o grupos hidroxil adecuados en el

5 compuesto de fórmula I. Amidas de pro-fármacos se forman a partir de la función amino del aminoácido o el extremo N del péptido y grupo o grupos carboxi adecuados en el compuesto de fórmula I, o de la función ácido del aminoácido o el extremo C del péptido y grupo o grupos amino adecuados en el compuesto de fórmula I. De manera particularmente preferida, las amidas de pro-fármacos se forman a partir del o de los grupos amino presentes en el grupo R de fórmula I.

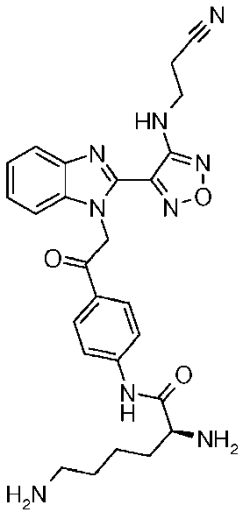
Más preferiblemente, el pro-fármaco se forma por la adición de glicina, alanina o lisina al compuesto de fórmula I.

Incluso más preferiblemente, el compuesto de fórmula general I está en forma de un pro-fármaco seleccionado de los compuestos de fórmulas:

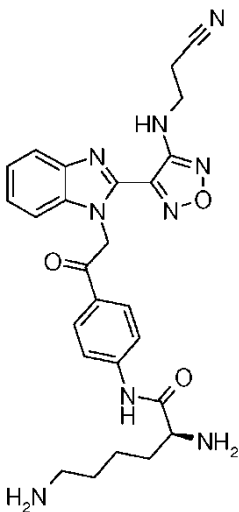




En una realización especialmente preferida, el compuesto está en forma de un pro-fármaco que tiene la siguiente fórmula

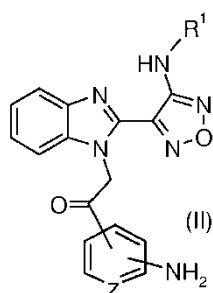


- 5 En una realización más especialmente preferida, el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una sal hidrocioruro del mismo, lo más preferiblemente una sal dihidrocioruro del mismo, de un compuesto de la siguiente fórmula



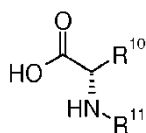
El metabolito farmacéuticamente activo in vivo en este caso es BAL27862.

Estos pro-fármacos se pueden preparar mediante procedimientos que son conocidos per se, en particular, un procedimiento en el que un compuesto de fórmula (II)



(II)

- 5 en donde R¹ se define como para la fórmula (I) y Z es CH o N, o un derivado de un compuesto de este tipo que comprende grupos funcionales en forma protegida, o una sal del mismo
 (1) se acila con un aminoácido de fórmula (III)



(III)

- 10 en donde R¹⁰ se selecciona de hidrógeno (Gly); metilo (Ala) y aminobutilo protegido (Lys) y R¹¹ es un grupo protector adecuado de amino, y
 (2) cualesquiera grupos protectores en un derivado protegido del compuesto resultante se separan para producir un pro-fármaco del compuesto (II) tal como se muestra arriba y, si se desea,
 (3) dicho pro-fármaco se convierte en una sal mediante tratamiento con un ácido, o una sal de un compuesto de
 15 fórmula (II) se convierte en el correspondiente compuesto libre de fórmula (II) o en otra sal, y/o una mezcla de compuestos de productos isoméricos se separa en los isómeros individuales.

- La acilación de un compuesto de fórmula (II) con un aminoácido de fórmula (III) se lleva a cabo de una manera conocida per se, habitualmente en presencia de un disolvente aprótico polar o dipolar adecuado, con enfriamiento o calentamiento según se requiera, por ejemplo en un intervalo de temperaturas de aproximadamente menos 80°C a
 20 aproximadamente más 150°C, más preferiblemente de menos 30°C a más 120°C, especialmente en un intervalo de aproximadamente alrededor de 0°C a la temperatura de reflujo del disolvente utilizado. Opcionalmente se añade una base adecuada, en particular una base aromática tal como piridina o colidina o una base de amina terciaria tal como trietilamina o diisopropiletilamina, o una sal inorgánica de carácter básico, p. ej., carbonato de potasio o de sodio.

- La acilación puede llevarse a cabo en las condiciones utilizadas para la formación de amidas conocida per se en la química de los péptidos, p. ej., con agentes activantes para el grupo carboxi tales como carbodiimidas tales como N,N'-dietil-, N,N'-dipropil-, N,N'-diisopropil-, N,N'-d ciclohexil-carbodiimida e hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminoisopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), o con agentes tales como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)-fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HATU), tetrafluoroborato de 2-(2-oxo-1-(2H)piridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TPTU), opcionalmente en presencia de bases, catalizadores o co-reactivos adecuados. El grupo
 30 carboxi puede también ser activado como haluro de acilo, preferiblemente como cloruro de acilo, p. ej., por reacción con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, o como anhídrido simétrico o asimétrico, p. ej., por reacción con halogenoformiatos tales como cloroformiato de etilo, opcionalmente en presencia de bases, catalizadores o co-reactivos adecuados.

- 35 Si uno o más de otros grupos funcionales, por ejemplo carboxi, hidroxilo o amino, están o necesitan ser protegidos en un compuesto de fórmula (II) o (III), debido a que no deben formar parte de la reacción, éstos son grupos protectores tales como los que se emplean normalmente en la síntesis de amidas tales como, en particular compuestos peptídicos, cefalosporinas, penicilinas, derivados de ácidos nucleicos y azúcares, que son conocidos por personas expertas. Grupos protectores adecuados para grupos amino son, por ejemplo, carbamato de t-butilo, carbamato de bencilo o carbamato de 9-fluorenilmetilo.

Los grupos protectores pueden estar ya presentes en precursores y deben proteger a los grupos funcionales en cuestión frente a reacciones secundarias no deseadas tales como alquilaciones, acilaciones, eterificaciones, esterificaciones, oxidaciones, solvolisis y reacciones similares. Es una característica de los grupos protectores que

se prestan fácilmente, es decir, sin reacciones secundarias no deseadas, a la separación, típicamente por solvólisis, reducción, fotólisis o también por actividad enzimática, por ejemplo bajo condiciones análogas a las condiciones fisiológicas, y que no están presentes en los productos finales. El especialista conoce, o puede establecer fácilmente, qué grupos protectores son adecuados con las reacciones mencionadas anteriormente en esta memoria y de aquí en adelante.

La protección de grupos funcionales de este tipo mediante tales grupos protectores, los propios grupos protectores, y sus reacciones de separación se describen, por ejemplo, en libros de referencia estándar para la síntesis de péptidos y en libros especiales sobre grupos protectores tales como

J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en "Methoden der organischen Chemie" (Methods of organic chemistry), Houben-Weyl, 4ª edición, Volumen 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, y en T. W. Greene, G. M. Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, Nueva York, 2006.

Enfermedad

Los compuestos de fórmula general I han demostrado detener la proliferación celular e inducir la muerte celular, por ejemplo por apoptosis.

La desregulación de la proliferación celular, o la falta de una muerte celular apropiada, tiene una amplia gama de implicaciones clínicas. Un cierto número de enfermedades asociadas con una desregulación de este tipo implican hiperproliferación, inflamación, remodelación y reparación de tejidos. Indicaciones familiares en esta categoría incluyen cánceres, restenosis, hiperplasia neointimal, angiogénesis, endometriosis, trastornos linfoproliferativos, patologías relacionadas con el trasplante (rechazo del injerto), poliposis, pérdida de la función neural en el caso de remodelación de tejidos y similares.

El cáncer se asocia con tasas de proliferación celular y muerte celular anormales. Dado que la apoptosis es inhibida o retrasada en la mayoría de los tipos de enfermedades proliferativas, neoplásicas, la inducción de la apoptosis es una opción para el tratamiento del cáncer, especialmente en tipos de cáncer que muestran resistencia a la quimioterapia clásica, la radiación y la inmunoterapia (Apoptosis and Cancer Chemotherapy, Hickman y Dive, comps., Blackwell Publishing, 1999). También en enfermedades y patologías autoinmunes y relacionadas con el trasplante se puede utilizar compuestos que inducen la apoptosis para restablecer los procesos de muerte celular normal y, por lo tanto, pueden erradicar los síntomas y podrían curar las enfermedades. Otras aplicaciones de compuestos que inducen la apoptosis pueden ser la restenosis, es decir, la acumulación de células de la musculatura lisa vascular en las paredes de las arterias, y en infecciones persistentes provocadas por un fallo de erradicar células infectadas por bacterias y virus. Además, la apoptosis puede ser inducida o restablecida en células epiteliales, en células endoteliales, en las células de la musculatura y en otras que han perdido contacto con la matriz extracelular.

Un compuesto de acuerdo con la fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se puede usar para el tratamiento profiláctico o especialmente terapéutico del cuerpo humano o animal, para el tratamiento de una enfermedad neoplásica. Ejemplos de tales enfermedades neoplásicas incluyen, pero no se limitan a neoplasias epiteliales, neoplasias de células escamosas, neoplasias de células basales, papilomas de células de transición y carcinomas, adenomas y adenocarcinomas, neoplasias anexiales y fanera, neoplasias mucoepidermoides, neoplasias quísticas, neoplasias mucinosas y serosas, neoplasias ducales, lobulares y medulares, neoplasias de células acinares, neoplasias epiteliales complejas, neoplasias gonadales especializadas, paragangliomas y tumores del glomus, nevus y melanomas, tumores de tejido blando y sarcomas, neoplasias fibromatosas, neoplasias mixomatosas, neoplasias lipomatosas, neoplasias miomatosas, neoplasias mixtas complejas y estromales, neoplasias fibroepiteliales, neoplasias tipo sinoviales, neoplasias mesoteliales, neoplasias de células germinales, neoplasias trofoblásticas, mesonefromas, tumores de los vasos sanguíneos, tumores de los vasos linfáticos, neoplasias óseas y condromatosas, tumores de células gigantes, tumores óseos misceláneos, tumores odontogénicos, gliomas, neoplasias neuroepiteliomatosas, meningiomas, tumores de la vaina nerviosa, tumores de células granulares y sarcomas de las partes blandas alveolares, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, otras neoplasias linforreticulares, tumores de células plasmáticas, tumores de mastocitos, enfermedades inmunoproliferativas, leucemias, trastornos mieloproliferativos misceláneos, trastornos linfoproliferativos y síndromes mielodisplásicos.

La enfermedad es cáncer.

Ejemplos de cánceres en términos de los órganos y partes del cuerpo afectadas incluyen, pero no se limitan al cáncer de mama, cuello uterino, ovario, colon, recto, (incluyendo colon y recto es decir, cáncer colorrectal), pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células grandes y mesotelioma), sistema endocrino, hueso, glándula adrenal, timo, hígado, estómago, intestino (incluyendo el cáncer gástrico), páncreas, médula ósea, tumores malignos hematológicos, (tales como

linfoma, leucemia, mieloma o tumores malignos linfoides), vejiga, tracto urinario, riñones, piel, tiroides, cerebro, cabeza, cuello, próstata y testículos. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer neuroendocrino, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, tumores malignos hematológicos, melanoma y sarcomas. De manera especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y melanoma. De manera más especialmente preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y melanoma.

Muestras

10 La medición de la concentración de fosfo-Akt se puede realizar *in vitro*, en una muestra de material biológico derivado del sujeto. La muestra puede ser cualquier material biológico separado del cuerpo tal como, por ejemplo, tejido normal, tejido tumoral, líneas celulares, plasma, suero, sangre entera, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, células tumorales circulantes, lisado celular, lisado tisular, orina y aspirados. Preferiblemente, la muestra se deriva del grupo que consiste en tejido normal, tejido tumoral, líneas celulares y células tumorales circulantes. Más
15 preferiblemente, la muestra se deriva de tejido tumoral o células tumorales circulantes. En una realización particularmente preferida, la muestra se deriva de tejido tumoral. Por ejemplo, la concentración de fosfo-Akt se puede medir en una muestra de tejido tumoral reciente, congelada o fijada en formalina/embebida en parafina.

La muestra se pre-obtiene del sujeto antes de que la muestra sea sometida a las etapas del método que implican medir la concentración del biomarcador. Los métodos para la separación de la muestra son bien conocidos en la
20 técnica, y puede ser separada, por ejemplo, del sujeto por biopsia, por ejemplo, mediante biopsia por punción, biopsia de núcleo, biopsia con aguja fina de aspiración, biopsia endoscópica o biopsia superficial. La muestra de sangre entera, plasma o suero puede ser recogida por punción venosa y puede ser procesada adicionalmente de acuerdo con técnicas estándar. Las células tumorales circulantes también pueden obtenerse a partir de sangre sobre la base de, por ejemplo, el tamaño (p. ej., ISET - Aislamiento por Tamaño de las Células Tumorales del Epitelio) o el enriquecimiento celular inmunomagnético (p. ej., CellSearch®, Veridex, Raritan, NJ).
25

Comparación de la muestra

El sujeto puede ser humano o animal. Preferiblemente, el sujeto es humano.

El biomarcador fosfo-Akt se mide *ex vivo* en una muestra o muestras tomadas del cuerpo humano o animal, tomada preferentemente del cuerpo humano. La muestra o muestras se pre-obtienen del cuerpo humano o animal,
30 preferiblemente se pre-obtienen del cuerpo humano antes de que la muestra se someta a las etapas del método que implica medir la concentración del biomarcador.

Un biomarcador es, en general, una sustancia que se utiliza como un indicador de una respuesta biológica, preferiblemente como un indicador de la susceptibilidad a un tratamiento dado, que en la presente solicitud es el tratamiento con un compuesto de fórmula general I o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

35 En una realización particularmente preferida, concentraciones elevadas de fosfo-Akt en la muestra con respecto a un valor estándar o conjunto de valores estándar predice resistencia.

Las concentraciones más elevadas de fosfo-Akt pueden aparecer debido a concentraciones más elevadas de Akt total en la muestra y/o un porcentaje más elevado de Akt que se ha fosforilado.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, un aumento o concentraciones relativamente altas o altas o mayores en relación con una concentración estándar o conjunto de concentraciones estándar significa la cantidad o concentración del biomarcador en una muestra es detectablemente mayor en la muestra con relación a la concentración estándar o conjunto de concentraciones estándar. Esto abarca al menos un incremento de, o una concentración mayor que, aproximadamente 1% con relación al estándar, preferiblemente al menos un aumento de aproximadamente 5% con relación al estándar. Más preferiblemente, es un incremento de, o una concentración
45 mayor que, al menos aproximadamente 10% con relación al estándar. De manera más particularmente preferida, es un incremento de, o una concentración mayor que, al menos aproximadamente 20% con relación al estándar. Por ejemplo, un incremento de, o una concentración mayor que, puede incluir, pero no se limita a, al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 50%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 100%, aproximadamente 150% o
50 aproximadamente 200% o más con respecto a la norma.

Preferiblemente, concentraciones más altas de fosfo-Akt en una muestra o muestras

- i) con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándar de sujetos con el mismo histotipo del tumor; o

- ii) con relación a un valor estándar o un conjunto de valores estándar a partir de células, tejidos o fluidos corporales normales;

son predictivas de resistencia.

5 La medición de una concentración de fosfo-Akt se lleva a cabo *ex vivo* en una muestra pre-obtenida del sujeto. Además, preferiblemente la respuesta que ha de ser predicha es la resistencia.

De manera especialmente preferida, concentraciones más altas de fosfo-Akt en una muestra o muestras con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándar de sujetos con el mismo histotipo del tumor son predictivas de resistencia.

10 En una realización preferida, para el caso i) en el que la medición se compara en una muestra o muestras con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándar a partir de muestras de sujetos con el mismo histotipo de tumor que la muestra a la que se ha de comparar, el valor estándar o conjunto de valores estándar se establece a partir de muestras de una población de sujetos con ese tipo de cáncer. Las muestras de estos sujetos estándar pueden derivarse, por ejemplo, del tejido tumoral o células tumorales circulantes, siempre que el origen de la muestra sea consistente entre el patrón y la muestra a comparar.

15 En otra realización preferida, para el caso ii) en el que la medición se compara en una muestra o muestras con respecto a un valor estándar o conjunto de valores estándar tomados a partir de células o tejidos normales, el valor estándar o un conjunto de valores estándar puede ser establecido a partir de una muestra de células normales (p. ej., no tumorales) o tejido o fluido corporal. Tales datos pueden ser recogidos de una población de sujetos con el fin de desarrollar el valor estándar o conjunto de valores estándar.

20 El valor estándar o conjunto de valores estándar se establece *ex vivo* de las muestras pre-obtenidas, que puede ser de líneas celulares o, preferiblemente, de material biológico tomado de al menos un sujeto y más preferiblemente de una media de sujetos (p. ej., n = 2 hasta 1000 o más). El valor estándar o conjunto de valores estándar puede entonces ser correlacionado con los datos de respuesta de las mismas líneas celulares, o mismos sujetos, al tratamiento con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. A partir de esta correlación, se puede establecer un módulo de comparador, por ejemplo, en forma de una escala o sistema de puntuación relativo, incluyendo opcionalmente los valores de corte o umbrales, que indique las concentraciones de biomarcador asociadas con un espectro de niveles de respuesta para el compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. El espectro de niveles de respuesta puede comprender la sensibilidad relativa con la actividad terapéutica del compuesto, (p. ej., alta sensibilidad a baja sensibilidad), así como la resistencia a la actividad terapéutica. En una realización preferida, este módulo de comparador comprende un valor de corte o conjunto de valores que predice resistencia al tratamiento.

35 Por ejemplo, si se utiliza un método inmunohistoquímico para medir la concentración de fosfo-Akt en una muestra, los valores estándar pueden estar en forma de un sistema de puntuación. Un sistema de este tipo podría tener en cuenta el porcentaje de células en las que está presente la tinción para la fosfo-Akt. El sistema también puede tener en cuenta la intensidad relativa de la tinción o la ubicación celular en las células individuales. Los valores estándar o el conjunto de valores estándar de la concentración de fosfo-Akt pueden entonces correlacionarse con datos que indican la respuesta, especialmente la resistencia del sujeto o tejido o línea celular a la actividad terapéutica de un compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. Tales datos pueden entonces formar parte de un módulo de comparador.

40 La respuesta es la reacción de las líneas celulares o, preferiblemente, del sujeto, o más preferiblemente de la enfermedad en un sujeto, a la actividad terapéutica de un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. El espectro de niveles de respuesta puede comprender la sensibilidad con respecto a la actividad terapéutica del compuesto (p. ej., alta sensibilidad a baja sensibilidad), así como la resistencia a la actividad terapéutica. Los datos de respuesta pueden ser monitoreados, por ejemplo, en términos de: 45 tasas de respuesta objetiva, tiempo hasta la progresión de la enfermedad, progresión de la supervivencia libre y la supervivencia global.

La respuesta de una enfermedad cancerosa se puede evaluar utilizando criterios bien conocidos por una persona en el campo del tratamiento del cáncer, por ejemplo, pero no restringido a:

50 directrices de criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST), Fuente: Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: directriz RECIST revisada (versión 1.1). Eur J Cancer.2009; 45:228-47;

RANO Criteria for High-Grade Gliomas, Fuente: Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB, Tsien C, Mikkelsen T, Wong ET, Chamberlain MC, Stupp R,

Lamborn KR, Vogelbaum MA, van den Bent MJ, Chang SM. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. J Clin Oncol. 2010;28(11):1963-72;

5 CA-125 Rustin Criteria for Ovarian Cancer Response, Fuente: Rustin GJ, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Pujade-Lauraine E, Jakobsen A, Eisenhauer E, Sagae S, Greven K, Vergote I, Cervantes A, Vermorken J. Re: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (ovarian cancer). J Natl Cancer Inst. 2004; 96(6):487-8;

y

10 PSA Working Group 2 Criteria for Prostate Cancer Response, Source: Scher HI, Halabi S, Tannock I, Morris M, Sternberg CN, Carducci MA, Eisenberger MA, Higano C, Bubley GJ, Dreicer R, Petrylak D, Kantoff P, Basch E, Kelly WK, Figg WD, Small EJ, Beer TM, Wilding G, Martin A, Hussain M; Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. J Clin Oncol. 2008;26(7):1148-59.

15 La resistencia se asocia con que no existe una reducción observable y/o medible en, o en ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células anormales, preferiblemente células cancerosas, o ausencia de las células anormales, preferiblemente células cancerosas; para enfermedades cancerosas: reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, reducido a cierto grado y preferiblemente detenido) de un crecimiento ulterior del tumor; reducción en las concentraciones de los marcadores tumorales tales como PSA y CA-125; inhibición (es decir, se redujo hasta cierto punto y preferiblemente se detuvo) de la infiltración de células cancerosas en otros órganos (incluyendo la extensión del cáncer en el tejido blando y los huesos); inhibición (es decir, se redujo hasta cierto punto y preferiblemente se detuvo) de la metástasis tumoral; alivio de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; y morbilidad y mortalidad reducidas.

20 En una realización preferida, resistencia significa que no hay reducción observable y/o medible en, o ausencia de, uno o más de los siguientes criterios: reducción del tamaño del tumor; inhibición del crecimiento ulterior del tumor; inhibición de la infiltración de células cancerosas en otros órganos; e inhibición de la metástasis tumoral.

25 En una realización más preferida, resistencia se refiere a uno o más de los siguientes criterios: ninguna reducción en el tamaño del tumor; ninguna inhibición del crecimiento ulterior del tumor, ninguna inhibición de la infiltración de células cancerosas en otros órganos; y ninguna inhibición de la metástasis tumoral.

30 La medición de los criterios de resistencia anteriormente mencionados es de acuerdo con las directrices clínicas bien conocidas por una persona en el campo del tratamiento del cáncer tales como las enumeradas anteriormente para la medición de la respuesta de una enfermedad cancerosa.

35 La respuesta también puede ser establecida mediante la evaluación in vitro de la proliferación celular y/o la muerte celular. Por ejemplo, los efectos sobre la muerte o la proliferación celular pueden ser evaluados in vitro por uno o más de los siguientes ensayos bien establecidos: A) tinción nuclear con colorante Hoechst 33342 que proporciona información sobre la morfología nuclear y la fragmentación de ADN que son distintivos de la apoptosis. B) Ensayo de unión a anexina V que refleja el contenido de fosfatidilserina de la bicapa lipídica externa de la membrana plasmática. Este evento se considera un distintivo temprano de la apoptosis. C) Ensayo TUNEL (ensayo de marcaje de extremo de corte de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal), un método de fluorescencia para evaluar las células sometidas a apoptosis o necrosis mediante la medición de la fragmentación del ADN marcando el extremo terminal de ácidos nucleicos. D) ensayo de proliferación MTS que mide la actividad metabólica de las células. Las células viables son metabólicamente activas, mientras que las células con una cadena respiratoria comprometida muestran una actividad reducida en esta prueba. E) ensayo de tinción con cristal violeta, en donde los efectos sobre el número de células se controlan mediante la tinción directa de los componentes celulares. F) ensayo de proliferación que monitorea la síntesis de ADN a través de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU). Pueden determinarse directamente efectos inhibitorios sobre el crecimiento/la proliferación. G) Ensayo YO-PRO que implica un colorante de ácidos nucleicos de cianina monomérica, fluorescente e impermeable a la membrana, que permite el análisis de la muerte (p. ej., apoptosis) de las células sin interferir en la viabilidad celular. También se pueden analizar efectos globales sobre el número de células después de la permeabilización celular. H) Tinción con yoduro de propidio para la distribución del ciclo celular que muestra alteraciones en la distribución entre las diferentes fases del ciclo celular. Se pueden determinar puntos que detienen el ciclo celular. I) Ensayos de crecimiento independiente del anclaje tales como ensayos del brote de colonias que evalúan la capacidad de las suspensiones de células individuales para crecer en colonias en agar blando.

45 En una realización preferida en relación con la determinación de la resistencia in vitro, resistencia significa que no hay disminución en la tasa de proliferación de células anormales y/o reducción en el número de células anormales. Más preferiblemente, resistencia significa que no hay disminución de la tasa de proliferación de células cancerosas y/o ninguna reducción en el número de células cancerosas. La reducción en el número de células anormales,

preferiblemente cancerosas, se puede producir a través de una diversidad de mecanismos de muerte celular programados y no programados. La apoptosis, la muerte celular programada independiente de caspasas y la muerte celular autofágica son ejemplos de la muerte celular programada. Sin embargo los criterios de muerte celular implicados en formas de realización de la invención no se han de tomar como limitados a ningún mecanismo de la muerte celular.

Fosfo-Akt

Tal como se ha definido anteriormente, el término Akt se utiliza en la presente memoria para englobar todos los sinónimos e isoformas mencionados previamente y fosfo-Akt es Akt que se ha fosforilado en uno o más residuos, siempre que para Akt1, Akt2 y Akt3 la designación fosfo-Akt se utilice para indicar fosforilación en un sitio que no sea T308, T309 o T305, respectivamente. Para clarificar esto aún más, la fosfo-Akt podrá estar o no estar fosforilada en T308, T309 o T305 para Akt1, Akt2 y Akt3, respectivamente, pero la designación fosfo-Akt indica fosforilación en sitios diferentes de estos.

Las secuencias proteicas de Akt (Akt humana) se enumeran en las SEQ ID NO. 1-3, Figuras 9-11. Sin embargo, el término Akt también engloba homólogos, formas mutantes, variantes alélicas, isoformas, variantes de corte y empalme y equivalentes de estas secuencias. Los homólogos, formas mutantes, variantes alélicas, isoformas, variantes de corte y empalme y equivalentes humanos de estas secuencias son las realizaciones más preferidas. Engloba secuencias que tienen al menos aproximadamente 95% de identidad respecto a cualquiera de las secuencias representadas por SEQ ID NO. 1-3. En una realización especialmente preferida, Akt corresponde a cualquiera de las secuencias representadas por las SEQ ID NO. 1-3 y las secuencias que tienen al menos 99% de identidad con cualquiera de estas secuencias. En una realización particularmente preferida, Akt corresponde a la secuencia representada por la SEQ ID NO.1 y las secuencias que tienen al menos 95% de identidad con esta secuencia, preferiblemente al menos 99% de identidad. En una realización más particularmente preferida, Akt corresponde a una secuencia representada por cualquiera de las SEQ ID NO. 1-3. En una realización aún más particularmente preferida, Akt corresponde a una secuencia representada por la SEQ ID NO.1.

Fosfo-Akt se referirá a Akt (donde sus realizaciones preferidas son tal como se proporcionan en el párrafo anterior) que se ha fosforilado en el siguiente residuo de serina:

para Akt1 (SEQ. ID. NO.1): S473;

para Akt2 (SEQ. ID. NO.2): S474; y

para Akt3 (SEQ. ID. NO.3): S472.

En otra realización especialmente preferida diferente, fosfo-Akt corresponde a cualquiera de las secuencias representadas por las SEQ ID NO. 1-3 y las secuencias que tienen al menos 99% de identidad con cualquiera de estas secuencias, y donde para la secuencia representada por la SEQ. ID. NO.1, S473 está fosforilado, o para la secuencia representada por la SEQ. ID. NO.2, S474 está fosforilado, o para la secuencia representada por la SEQ. ID. NO.3, S472 está fosforilado.

En una realización muy particularmente preferida, fosfo-Akt corresponde a una secuencia representada por la SEQ ID NO. 1 que está fosforilada en S473.

Concentración de fosfo-Akt

La concentración de fosfo-Akt puede someterse a ensayo en la muestra por medios técnicos bien conocidos para una persona experta. Ejemplos de métodos de análisis de expresión de proteínas conocidos en la técnica que son adecuados para medir la concentración de fosfo-Akt al nivel de proteínas incluyen, pero no se limitan a i) análisis de inmunohistoquímica (IHC), ii) transferencia western, iii) inmunoprecipitación iv) ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), v) radioinmunoensayo, vi) clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) vii) espectrometría de masas, incluyendo desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI, p. ej., MALDI-MS) o electroproyección (ESI-MS).

Los anticuerpos implicados en algunos de los métodos anteriores pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos de anticuerpos y/o diversos tipos de anticuerpos sintéticos, incluidos anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede estar marcado para permitir que sea detectado o sea susceptible de detección tras la reacción con una o más especies adicionales, por ejemplo, utilizando un anticuerpo secundario que está marcado o es capaz de producir un resultado detectable. Anticuerpos específicos para la fosfo-Akt están disponibles comercialmente de Cell Signaling o se pueden preparar a través de métodos convencionales de generación de anticuerpos, bien conocidos para una persona experta.

Métodos preferidos de análisis de proteínas son ELISA, técnicas de espectrometría de masas, inmunohistoquímica y transferencia western, más preferiblemente ELISA, transferencia de western e inmunohistoquímica, de manera

particularmente preferida transferencia western e inmunohistoquímica. En la transferencia western, también conocida como inmunotransferencia, se pueden utilizar anticuerpos marcados para evaluar las concentraciones de proteína, en donde la intensidad de la señal procedente del marcador detectable corresponde a la cantidad de proteína, y se puede cuantificar, por ejemplo, mediante densitometría.

- 5 La inmunohistoquímica utiliza de nuevo anticuerpos marcados para detectar la presencia y cantidad relativa del biomarcador. Se puede utilizar para evaluar el porcentaje de células para las cuales el biomarcador está presente. También se puede utilizar para evaluar la localización o la cantidad relativa del biomarcador en células individuales; esto último se ve como una función de la intensidad de tinción.

- 10 ELISA significa ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas, ya que utiliza una enzima enlazada a un anticuerpo o antígeno para la detección de una proteína específica. El ELISA se realiza típicamente como sigue (aunque existen otras variaciones en la metodología): un sustrato sólido tal como una placa de 96 pocillos se recubre con un anticuerpo primario, que reconoce el biomarcador. El biomarcador unido es reconocido a continuación por un anticuerpo secundario específico para el biomarcador. Esto puede estar unido directamente a una enzima o se puede utilizar un tercer anticuerpo anti-inmunoglobulina que se une a una enzima. Se añade un sustrato y la enzima cataliza una reacción, produciendo un color específico. Mediante la medición de la densidad óptica de este color, se puede determinar la presencia y cantidad del biomarcador.

Usos de biomarcador

- 20 El biomarcador puede ser utilizado para predecir la resistencia inherente de la enfermedad en un sujeto al compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente.

- 25 El biomarcador puede ser utilizado para seleccionar sujetos que padecen o están predispuestos a padecer la enfermedad, para el tratamiento con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente. Las concentraciones de un biomarcador de este tipo se pueden utilizar para identificar a los sujetos susceptibles a responder o a no responder al tratamiento con dichos agentes. La estratificación de los sujetos se puede hacer con el fin de evitar regímenes de tratamiento innecesarios. En particular, el biomarcador se puede utilizar para identificar a sujetos de los que una muestra o muestras no exhiben una mayor concentración de fosfo-Akt, con relación a una concentración estándar o un conjunto de concentraciones estándar, después de lo cual esos sujetos pueden entonces ser seleccionados para el tratamiento con el compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente.

- 30 El biomarcador también se puede utilizar para ayudar en la determinación de los regímenes de tratamiento, en relación con cantidades y programas de dosificación. Adicionalmente, el biomarcador puede ser utilizado para ayudar en la selección de una combinación de fármacos a ser administrados a un sujeto, incluyendo un compuesto o compuestos de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos, y otro agente o agentes quimioterapéuticos (citotóxicos). Además, el biomarcador puede ser utilizado para ayudar en la determinación de estrategias de terapia en un sujeto, incluyendo si un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo se ha de administrar en combinación con una terapia dirigida, terapia endocrina, radioterapia, inmunoterapia o intervención quirúrgica, o una combinación de estos.

- 40 La fosfo-Akt también se puede utilizar en combinación con otros biomarcadores para predecir la respuesta a un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo y para determinar los regímenes de tratamiento. Además, se puede utilizar en combinación con pruebas de quimio-sensibilidad para predecir la resistencia y para determinar los regímenes de tratamiento. Pruebas de quimio-sensibilidad consisten en aplicar directamente un compuesto de fórmula general I de células tomadas del sujeto, por ejemplo, de un sujeto con tumores malignos hematológicos o tumores sólidos accesibles, por ejemplo, cánceres de mama, de cabeza y cuello o melanomas, para determinar la respuesta de las células al compuesto.

Método de tratamiento

- 50 En un método de tratamiento y en fosfo-Akt para uso en un método de tratamiento, la concentración de fosfo-Akt se establece primero en relación con una concentración estándar o conjunto de concentraciones estándar y luego se administra un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente, si la concentración de fosfo-Akt en dicha muestra no es mayor que un valor estándar o un conjunto de valores estándar. El compuesto de fórmula I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse en una composición farmacéutica, como es bien conocido por una persona experta en la técnica. Composiciones y dosificaciones adecuadas se describen, por ejemplo, en el documento WO 2004/103994 A1, páginas 35-39. Las composiciones para administración enteral, tal como administración nasal, bucal, rectal o, especialmente, oral, y para la administración parenteral tal como administración intravenosa, intramuscular o subcutánea a animales de sangre caliente, especialmente seres humanos, son especialmente preferidas. Más particularmente, se prefieren las composiciones para administración intravenosa.

Las composiciones comprenden el ingrediente activo y un soporte farmacéuticamente aceptable. Un ejemplo de una composición incluye, pero no se limita a lo siguientes: 5000 cápsulas de gelatina blanda, comprendiendo cada una como ingrediente activo 0.05 g de uno de los compuestos de fórmula general (I), se preparan como sigue: 250 g de ingrediente activo pulverizado se suspenden en 2 litros de Lauroglykol® (laurato de propilenglicol, Gattefossé S.A., Saint Priest, Francia) y se muelen en un pulverizador húmedo para producir un tamaño de partícula de aproximadamente 1 a 3 µm. Porciones de 0,419 g de la mezcla se introducen luego en cápsulas de gelatina blanda utilizando una máquina de llenado de cápsulas.

En esta memoria también se describe un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica o autoinmune, preferiblemente cáncer, disminuyendo primero la concentración de fosfo-Akt en un sujeto que tiene una muestra con una mayor concentración de fosfo-Akt en comparación con una concentración estándar o un conjunto de concentraciones estándar, a continuación, tratando al sujeto con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable tal como se define anteriormente. La concentración de fosfo-Akt puede ser reducida por medios químicos o genéticos directos o indirectos. Ejemplos de tales métodos son el tratamiento con un fármaco que resulta en una concentraciones reducidas de fosfo-Akt, la administración dirigida de construcciones virales, de plásmidos o de péptidos, o anticuerpo o ARNip o antisentido para regular a la baja la concentración de fosfo-Akt. Por ejemplo, ARNip se puede utilizar para reducir la concentración de rictor expresado y reducir de esta manera la formación y actividad del complejo mTORC2 y así reducir de manera indirecta la concentración de Akt fosforilada. El sujeto puede entonces ser tratado con un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Una terapia de combinación posible puede adoptar la forma de combinaciones fijas, o la administración de un compuesto y uno o más de otros agentes terapéuticos que se administran escalonada o independientemente uno de otro, o la administración combinada de combinaciones fijas y uno o más de otros agentes terapéuticos. Un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo puede, aparte de o además de, ser administrado especialmente para la terapia de tumores en combinación con quimioterapia (citotóxica), terapia dirigida, terapia endocrina, radioterapia, inmunoterapia, intervención quirúrgica, o una combinación de estos. La terapia a largo plazo es igualmente posible como lo es la terapia adyuvante en el contexto de otras estrategias de tratamiento, tal como se describió anteriormente. Otros tratamientos posibles son terapia para mantener el estado del paciente después de la regresión del tumor, o incluso terapia quimio-preventiva, por ejemplo, en pacientes en riesgo.

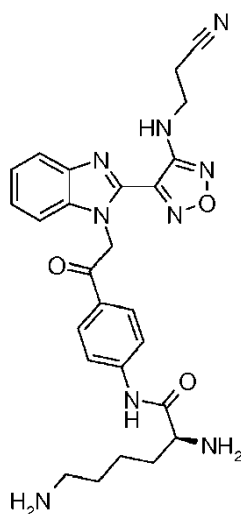
Kit

En un aspecto, la invención se refiere a un kit para predecir la respuesta, preferiblemente de una enfermedad en un sujeto, a un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define anteriormente, que comprende los reactivos necesarios para medir la concentración de fosfo-Akt en una muestra. Los reactivos comprenden un reactivo de captura que comprende un detector para fosfo-Akt y un reactivo detector.

El kit también comprende un módulo de comparador que comprende un valor estándar o un conjunto de valores estándar con los que se compara la concentración de fosfo-Akt en la muestra. En una realización preferida, el módulo de comparador está incluido en las instrucciones de uso del kit. En otra realización preferida, el módulo de comparador está en forma de un dispositivo de visualización, por ejemplo una tira de color o de material numéricamente codificado que está diseñado para ser colocado junto a la lectura de la medición de la muestra para indicar los niveles de resistencia. El valor estándar o un conjunto de valores estándar se puede determinar tal como se describe anteriormente.

Los reactivos son preferiblemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a fosfo-Akt. Estos puede estar, por ejemplo, en forma de un anticuerpo primario específico que se une a fosfo-Akt y un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario, y que es en sí mismo marcado para la detección. El anticuerpo primario también puede marcarse para la detección directa. Los kits o dispositivos pueden contener también, opcionalmente, una disolución o disoluciones de lavado que permiten selectivamente la retención del biomarcador unido al reactivo de captura en comparación con otros biomarcadores después del lavado. Tales kits se pueden utilizar en ELISA, transferencia western, citometría de flujo, métodos inmunohistoquímicos o inmunquímicos de otro tipo para detectar la concentración del biomarcador.

El kit comprende un compuesto de fórmula general I o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido anteriormente. Este compuesto se puede administrar a continuación al sujeto, de acuerdo con la concentración del biomarcador en la muestra del sujeto, según se haya medido con los reactivos que comprende el kit. Por lo tanto, el kit de acuerdo con la invención se puede utilizar en el método de tratamiento, tal como se ha definido anteriormente. En una realización especialmente preferida, el kit comprende un compuesto de la siguiente fórmula o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo



En una realización particularmente preferida del kit la sal farmacéuticamente aceptable es una sal dihidrocloruro. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit de este tipo tal como se describió anteriormente.

- 5 En la presente memoria descriptiva las palabras "comprenden" o "comprende" o "que comprende" han de entenderse como que implican la inclusión de un elemento indicado o grupo de elementos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o grupo de elementos.

Metodología experimental

Tinción inmunofluorescente de células cultivadas

- 10 Células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas A549 (NSCLC, número de referencia ATCC CCL-185), células de cáncer cervical HeLa (número de referencia ATCC CCL-2) y células de carcinoma de mama SKBR3 (ATCC número de referencia HTB-30) se sembraron a densidades de 50% en cubreobjetos de microscopio redondos y se cultivaron durante 24 horas en RPMI-1640 que contiene FCS al 10% (al que también se alude como FBS) a 37°C, 5% de CO₂. Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO. El medio de cultivo celular se reemplazó por medio que contiene el o los compuestos diluidos (paclitaxel, vinblastina, colchicina y nocodazol se adquirieron de Sigma-Aldrich) o vehículo. Después del tratamiento durante los tiempos indicados en la Breve Descripción de las Figuras, los cubreobjetos se lavaron y las células se fijaron en metanol/acetona (1:1) durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron en tampón de bloqueo (BSA al 0,5% y TX -100 al 0,1% en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas luego con anticuerpo anti-tubulina alfa (Sigma, 1:2000) durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de bloqueo. Después de varias etapas de lavado, las células se incubaron con IgG anti-ratón de cabra AlexaFluor-488 (Molecular Probes, 1:3000) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de varias etapas de lavado con tampón de bloqueo. Las muestras fueron montadas después con el agente anti-decoloración ProLong Gold (Molecular Probes), sellado con esmalte de uñas y examinado con un microscopio Leica de inmunofluorescencia. Las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD enfriada y procesadas por el software ImageJ.

25 Ensayo del Brote de Colonias:

- Se prepararon suspensiones de células individuales de xenoinjertos tumorales derivados de pacientes (mantenidos en ratones inmunodeficientes). Para los ensayos del brote de colonias, las células se extendieron en agar blando en placas de 24 pocillos de acuerdo con el ensayo introducido por Hamburger y Salmon (bioensayo primario de células madre tumorales humana, Science, 1977, 197: 461-463). 2×10^4 - 6×10^4 células en 0,2 mL de medio que contiene 0,4% de agar se extendieron sobre una capa inferior de 0,75% de agar. Los compuestos de ensayo se aplicaron en 0,2 mL de medio de cultivo. Cada una de las placas de 24 pocillos contenía controles sin tratar y muestras por triplicado. Los cultivos se incubaron a 37°C y 7,5% de CO₂ durante 5 - 28 días. 24 horas antes del análisis, las colonias vitales se tiñeron con una disolución de sal de tetrazolio metabolizable (Alley MC et al, Life Sci. 1982, 31:3071-3078) y se contaron con un sistema de análisis de imágenes automático (Omnicon 3600, Biosys GmbH).
- 35 Los efectos de los fármacos relativos se expresaron por la relación del número medio de colonias en los pocillos tratados y los pocillos control. Los valores CI₇₀ fueron determinados mediante la representación de las concentraciones de compuestos frente a los recuentos de colonias relativos.

Extracción de Proteínas

5 Los tumores se extrajeron en tampón enfriado en hielo que contenía HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, β -glicerofosfato 25 mM, NaF 25 mM, EGTA 5 mM, EDTA 1 mM, NP40 al 0,1%, pirofosfato 15 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, molibdato de sodio 10 mM, leupeptina (10 μ g/mL), aprotinina (10 μ g/mL) y PMSF 1 mM (1 mL de volumen de extracción por 45 mg de tumor). Después de la homogeneización por Polytron, los lisados se ajustaron a NP40 al 1% y se incubaron en hielo durante 20 min. Los lisados se clarificaron por centrifugación y se congelaron a -80°C.

Inmunotransferencia/Transferencia Western

10 La inmunotransferencia se realizó utilizando 20 μ g de proteína total por pista. La concentración de proteína se determinó con el ensayo de proteínas BCA (Pierce). La proteína se separó en un gel de SDS al 10% y se transfirió a una membrana de PVDF utilizando la transferencia húmeda (45 min, 250 mA/gel). Los anticuerpos primarios utilizados para la inmunotransferencia eran como sigue:

Fosfo-Akt (serina 473) (disponible de Cell Signalling número de referencia 9271) origen: anticuerpo policlonal de conejo, dilución 1:1000, condiciones del tampón: PBS que contiene 0,5% de leche/Tween al 0,1%

15 Proteína Akt (disponible de Epitomics, número de referencia 1085-1) origen: anticuerpo monoclonal de conejo, dilución 1:2000, condiciones del tampón: PBS que contiene 0,5% de leche/Tween al 0,1%;

Actina: (disponible de Chemicon, número de referencia MAB1501) origen: ratón, monoclonal, dilución 1:5000, condiciones del tampón: PBS que contiene 0,5% de leche/Tween al 0,1%.

20 Los anticuerpos secundarios utilizados para la inmunotransferencia eran anti-conejo de cabra o anti-ratón de cabra conjugados con peroxidasa (disponibles de Jackson ImmunoResearch Laboratories INC: número de referencia 111-035-144 JIR y 115-035-146 JIR), dilución 1:5000, condiciones del tampón: 0,5% de leche en PBS/Tween al 0,1%. Las bandas marcadas fueron reveladas utilizando un sistema de formación de imágenes de alto rendimiento Raytest Stella 3200.

Inmunohistoquímica

25 La fijación de xenoinjertos de tumores derivados del paciente (mantenido en ratones inmunodeficientes) se realizó en formalina neutra tamponada al 10% que contenía formaldehído al 4% durante 20 - 28 horas a temperatura ambiente. Muestras fijadas se mantuvieron en una disolución de etanol al 70% durante un máximo de una semana antes de la deshidratación e inclusión en parafina de acuerdo con un procedimiento estándar, utilizando las condiciones enumeradas a continuación:

Tratamiento Secuencial	tiempo (horas)
EtOH al 70%	1
EtOH al 80%	2
EtOH al 99%	1
Isopropanol al 100%	0,5
Isopropanol al 100%	1
Xilol	0,5
Xilol	1
Xilol	1
Parafina	1
Parafina	2
Parafina	2

30 Secciones de parafina de aproximadamente 2 μ m se cortaron y se procesaron utilizando el aparato de inmunotinción automatizado Benchmark XT® (Roche) ejecutando las etapas de procesamiento estándar. La visualización de la tinción de anticuerpos específicos se realizó con DAB (3,3-diaminobencidina) como sustrato cromogénico a una concentración de 5 mg/ml. Para la tinción se utilizaron las siguientes condiciones de anticuerpos primarios y de procesamiento:

Especificación de anticuerpos	Procesamiento
Anti-Akt-pS473 de Dako, nº M3628 anticuerpo monoclonal de conejo	MTec100/30: tampón de recuperación de EDTA-citrato pH 8, 100 °C durante 30 minutos. Incubación de anticuerpos a 37 °C durante 32 minutos con una dilución de 1:20

Ejemplos detallados

Ejemplo 1: Un fenotipo mitótico distinto inducido por compuestos de fórmula general I

5 El tratamiento con el compuesto A (BAL27862) o con el compuesto B o el compuesto C inducía un fenotipo de microtúbulos altamente reproducible y distinto en todas las líneas celulares tumorales ensayadas (mostradas para BAL27862 en A549, células HeLa y SKBR3 en la Figura 1 y para el compuesto C y el compuesto B en células A549 en la Figura 2). En células en división, se produjo una fragmentación aparente del huso mitótico, lo que resulta en la formación de estructuras a modo de puntos (Figura 1). Se demostró que este fenotipo era distinta del observado con agentes convencionales que fijan como objetivo microtúbulos tales como el estabilizador de microtúbulos paclitaxel y los desestabilizadores de microtúbulos vinblastina y colchicina (Figura 3) y nocodazol (Figura 4).

10 Ejemplo 2: BAL27862 supera el fenotipo de microtúbulos inducido por fármacos convencionales que fijan como objetivo microtúbulos de una manera dominante

15 Con el fin de mostrar la singularidad de su actividad sobre los microtúbulos, BAL27862 fue sometido a ensayo en combinación con vinblastina, colchicina y paclitaxel (Figura 5) y nocodazol (Figura 6) utilizando células A549. El tratamiento con vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol por sí solo inducía los fenotipos de los microtúbulos mitóticos característicos de estos agentes. Sin embargo, el tratamiento de combinación con BAL27862 durante las últimas 4 horas dio lugar a la interrupción de las estructuras de microtúbulos; creando un fenotipo compatible con el tratamiento de BAL27862 solo, a pesar de la presencia continua de vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol. En contraposición, el tratamiento primero con BAL27862 y posteriormente durante 4 horas en combinación con vinblastina, colchicina, paclitaxel o nocodazol no tuvo impacto en el fenotipo de microtúbulos observado que era consistente con el tratamiento con BAL27862.

20 Estos datos demuestran que los compuestos de fórmula I afectan a la biología de los microtúbulos consistentemente, pero de una manera diferente que los agentes convencionales de fijación como objetivo de microtúbulos.

Ejemplos detallados de acuerdo con la invención

25 **Ejemplo 3: Asociación de altos niveles de expresión de fosfo-Akt con células tumorales derivadas de pacientes resistentes al tratamiento con BAL27862.**

30 Sobre la base de ensayos del brote de colonias, utilizando células tumorales derivadas de tumores derivados de 8 pacientes mantenidos como xenoinjertos en ratones, células tumorales sensibles a BAL27862 o resistentes se identificaron a partir de cáncer gástrico, cáncer colorrectal, melanoma y cáncer de pulmón (véase la Tabla 1). Las concentraciones a las que se observó un 70% de inhibición del crecimiento *frente a* los controles (CI_{70}) se muestran en la Tabla 1. En esta tabla, las células tumorales sensibles a BAL27862 eran las que tuvieron valores CI_{70} en el intervalo nanomolar bajo, mientras que las células tumorales resistentes a BAL27862 tuvieron valores $CI_{70} > 600$ nanomolares. Datos de paclitaxel y vinblastina, utilizando el mismo ensayo *ex vivo*, estaban disponible para 7 de los 8 modelos tumorales. De estos 7 modelos, todos eran resistentes al tratamiento con paclitaxel, mientras que 6 eran sensibles al tratamiento con vinblastina.

35 Tabla 1

Tipo de cáncer	Nombre	Respuesta a BAL27862	CI_{70} BAL27862 [micromolar]	Respuesta a paclitaxel	Respuesta a vinblastina
Gástrico	GFX 251	Sensible	0,485	Resistente	Sensible
Gástrico	GFX 97	Resistente	>3,5	Resistente	Sensible
De pulmón	LXFE 211	Sensible	0,021	Resistente	Sensible
De pulmón	LXFE 397	Resistente	>3,5	No conocida	No conocida
Melanoma	MEXF 1341	Sensible	0,025	Resistente	Sensible
Melanoma	MEXF 276	Resistente	>3,5	Resistente	Sensible
Colorrectal	CXF 1103	Sensible	0,022	Resistente	Resistente
Colorrectal	CXF 243	Resistente	0,696	Resistente	Sensible

El análisis de inmunotransferencia se realizó con el fin de medir las concentraciones de fosfo-Akt (utilizando un anticuerpo que reconoce la serina-473 fosforilada) y de proteína Akt en los mismos tumores mantenidos como xenoinjertos. Las concentraciones de actina se incluyeron en la inmunotransferencia como control de carga.

El análisis de las concentraciones de fosfo-Akt indica que las concentraciones de fosfo-Akt variaron a lo largo de los tumores (Figura 7).

5 Basado en el ensayo del brote de colonias y los mismos criterios de Cl_{70} , no hubo asociación entre resistencia a paclitaxel o vinblastina y altos niveles de expresión de fosfo-Akt (compare la Figura 7 con la Tabla 1). Esto es evidente, por ejemplo, en los modelos de cáncer gástrico. Aunque GXF 251 y GXF 97 eran ambos resistentes a paclitaxel, para GX 251 las concentraciones de fosfo-Akt eran virtualmente indetectables, mientras que para GXF 97, las concentraciones eran claramente superiores. La misma falta de asociación era cierta para el alcaloide de la vinca, vinblastina, en los modelos de cáncer gástrico, ya que ambos de esos tumores eran sensibles a vinblastina. Esta falta de asociación se repitió en los modelos de cáncer colorrectal y melanoma. Por lo tanto, las concentraciones de fosfo-Akt demostraron ser inadecuadas como un biomarcador fiable de la resistencia a los agentes de microtúbulos convencionales paclitaxel y vinblastina en modelos de tumores derivados del paciente.

10 Sorprendentemente, por el contrario, cuando los datos de resistencia a BAL27862, definidos según el ensayo del brote de colonias, se compararon con la concentración de fosfo-Akt, la expresión de fosfo-Akt demuestra ser más alta sólo en los tumores resistentes y no en los tumores sensibles derivados del mismo histotipo de tumor (compare la Figura 7 con la Tabla 1). Niveles de expresión incrementados eran por lo tanto consistentemente indicativos de resistencia a BAL27862. Por lo tanto, las concentraciones de fosfo-Akt demostraron ser un biomarcador de la resistencia para el compuesto BAL27862.

Ejemplo 4: Análisis inmunohistoquímico de xenoinjertos de tumores gástricos

20 El análisis inmunohistoquímico se realizó en los xenoinjertos de tumores gástricos (Figura 8), revelando una concentración más alta de fosfo-Akt en el modelo de tumor GXF 97. Una vez más se observó una clara correlación entre las concentraciones más altas de fosfo-Akt y la resistencia a BAL27862 (el modelo de tumor CXF 251 era resistente a BAL27862, mientras que el modelo de tumor GXF era sensible a BAL27862; tal como se define mediante el ensayo del brote de colonias-Tabla 1). Por lo tanto, las concentraciones de fosfo-Akt demuestran de nuevo ser un biomarcador de la resistencia para el compuesto BAL27862.

25 Lista de abreviaturas

A549	línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana
BCA	ácido bicinconínico
BrdU	bromodesoxiuridina
BSA	albúmina de suero bovino
30 CA-125	antígeno de cáncer 125
CCD	dispositivo de carga acoplada
CREST	síndrome de esclerodermia limitada
DAB	3,3-diaminobencidina
DMSO	dimetilsulfóxido
35 ADN	ácido desoxirribonucleico
dUTP	2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas
40 ESI-MS	espectrometría de masas por ionización por electroproyección
EtOH	Etanol
FACS	exploración/clasificación de células activadas por fluorescencia
FCS/FBS	suero de ternera fetal / bovino fetal
G2/M	transición de G2 a la fase mitótica del ciclo celular
45 HeLa	línea celular de cáncer de células escamosas humana
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
Hoe33342	trihidrocloruro de 2'-(4'-etoxifenil)-5-(4-metil-piperazin-1-il)-2,5'-bis-1H-bencimidazol trihidrato
Cl_{70}	concentración a la cual se inhibe 70% de la señal
IgG	inmunoglobulina G
50 IHC	inmunohistoquímica
ISET	aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales
MALDI	espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
mTORC2	complejo 2 de la diana de rapamicina de mamíferos
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
55 NaF	fluoruro de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
NSCLC	cáncer de pulmón de células no pequeñas
NP40	Nonidet P40
PBS	solución salina tamponada con fosfato

ES 2 627 972 T3

	P-gp	glicoproteína P
	PKB	proteína-cinasa B
	PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
	PSA	antígeno específico de la próstata
5	PVDF	poli(fluoruro de vinilideno)
	RAC	relacionado con las cinasas A y B
	RANO	evaluación de la respuesta para gliomas de alto grado
	RECIST	criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos
	RICTOR	compañero de mTOR insensible a la rapamicina
10	RPMI-1640	medio de cultivo celular utilizado para el cultivo de células eucarióticas y líneas celulares transformada y no transformadas
	SDS	dodecilsulfato de sodio
	SEQ. ID NO.	número de identificación de la secuencia
	ARNip	ácido ribonucleico inhibidor pequeño
15	SKBR3	línea celular de carcinoma mamario humano
	TUNEL	ensayo de marcaje de extremo de corte de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal
	Tween	detergente no iónico
20	YO-PRO	colorante de ácidos nucleicos de cianina monomérica, fluorescente

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Basilea Pharmaceutica AG

<120> Uso de fosfo-Akt como un biomarcador de la respuesta a fármacos

<130> 22041

5 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

< 211> 480

< 212> PRT

10 < 213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly
1 5 10 15

Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp
20 25 30

Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg
35 40 45

Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys
50 55 60

Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp
65 70 75 80

Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg
85 90 95

Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys
100 105 110

Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn
115 120 125

Ser Gly Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg
130 135 140

Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr
145 150 155 160

Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr
165 170 175

Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val
180 185 190

ES 2 627 972 T3

Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro
 195 200 205

Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys
 210 215 220

Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser
 225 230 235 240

Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu
 245 250 255

Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr
 260 265 270

Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile
 275 280 285

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala
 290 295 300

Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val
 305 310 315 320

Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly
 325 330 335

Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln
 340 345 350

Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe
 355 360 365

Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu
 370 375 380

Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys
 385 390 395 400

Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val
 405 410 415

Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu
 420 425 430

Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr
 435 440 445

Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu
 450 455 460

Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala
 465 470 475 480

<210> 2

ES 2 627 972 T3

< 211> 481

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Glu Val Ser Val Ile Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly
1 5 10 15

Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Ser Asp
20 25 30

Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Glu Ala Pro Asp Gln Thr
35 40 45

Leu Pro Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Glu Cys Gln Leu Met Lys
50 55 60

Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Val Ile Arg Cys Leu Gln Trp
65 70 75 80

Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Ser Pro Asp Glu Arg
85 90 95

Glu Glu Trp Met Arg Ala Ile Gln Met Val Ala Asn Ser Leu Lys Gln
100 105 110

Arg Ala Pro Gly Glu Asp Pro Met Asp Tyr Lys Cys Gly Ser Pro Ser
115 120 125

Asp Ser Ser Thr Thr Glu Glu Met Glu Val Ala Val Ser Lys Ala Arg
130 135 140

Ala Lys Val Thr Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys
145 150 155 160

Gly Thr Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Thr Gly Arg
165 170 175

Tyr Tyr Ala Met Lys Ile Leu Arg Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp
180 185 190

Glu Val Ala His Thr Val Thr Glu Ser Arg Val Leu Gln Asn Thr Arg

ES 2 627 972 T3

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg Gly
 1           5           10           15

Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr Asp
 20           25           30

Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu Pro
 35           40           45

Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys Thr
 50           55           60

Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr
 65           70           75           80

Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg Glu
 85           90           95

Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg Gln
 100          105          110

Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn Ile
 115          120          125

Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys Thr
 130          135          140

Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly
 145          150          155          160

Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala Met
 165          170          175

Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala His
 180          185          190

```

ES 2 627 972 T3

Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe Leu
 195 200 205

Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe Val
 210 215 220

Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu
 225 230 235 240

Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val
 245 250 255

Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp Leu
 260 265 270

Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr
 275 280 285

Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met Lys
 290 295 300

Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp
 305 310 315 320

Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met
 325 330 335

Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu
 340 345 350

Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr
 355 360 365

Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp
 370 375 380

Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile Met
 385 390 395 400

Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys
 405 410 415

Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr
 420 425 430

Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr Pro
 435 440 445

Pro Glu Lys Tyr Asp Glu Asp Gly Met Asp Cys Met Asp Asn Glu Arg
 450 455 460

Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Arg Glu
 465 470 475

REIVINDICACIONES

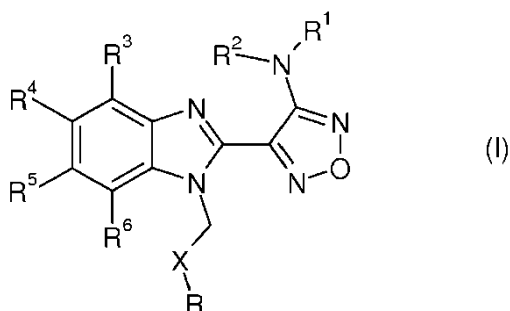
1. Uso de fosfo-Akt como un biomarcador para predecir la respuesta a un compuesto, en donde la fosfo-Akt es Akt que se ha fosforilado en uno o más residuos, en donde la Akt se representa mediante la SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 o SEQ. ID. O. 3 y secuencias que tienen al menos 95% de identidad con cualquiera de esas secuencias, y en donde la Akt se ha fosforilado en los siguientes residuos de serina:

para la SEQ. ID. NO. 1 y las secuencias que tienen al menos 95% de identidad con la SEQ. ID. NO. 1: S473;

para la SEQ. ID. NO. 2 y las secuencias que tienen al menos 95% de identidad con la SEQ. ID. NO. 2: S474; y

para la SEQ. ID. NO. 3 y las secuencias que tienen al menos 95% de identidad con la SEQ. ID. NO. 3: S472;

en donde el compuesto es un compuesto de fórmula general (I),



en donde

R representa fenilo, tienilo o piridinilo,

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman, junto con el nitrógeno, heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxo; y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa un grupo C=Y, en donde Y representa oxígeno o nitrógeno sustituido con hidroxialcoxi inferior;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxo;

o en donde

R representa fenilo o piridinilo,

en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, halo-alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, alcoxi inferior-alquilo inferior, aciloxi-alquilo inferior, fenilo, hidroxialcoxi inferior, hidroxialcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi inferior, fenil-alcoxi inferior, alquil inferior-carboniloxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alcoxi inferior-carbonilamino, alquil inferior-carbonilamino, amino sustituido, en donde los dos sustituyentes en nitrógeno forman junto con el nitrógeno un heterociclilo, alquil inferior-carbonilo, carboxi, alcoxi inferior-carbonilo, formilo, ciano, halógeno y nitro; y en donde dos sustituyentes adyacentes son metilendioxo;

y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con alcoxi inferior, amino o halógeno;

X representa oxígeno;

R¹ representa hidrógeno, alquil inferior-carbonilo, hidroxialquilo inferior o ciano-alquilo inferior;

R², R³ y R⁶ representan hidrógeno;

R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro, representan hidrógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior;

o R⁴ y R⁵ juntos representan metilendioxo;

y derivados farmacéuticamente aceptables del mismo, seleccionándose dichos derivados del grupo que consiste en una sal y solvato de ese compuesto, ésteres y amidas de ese compuesto con aminoácidos de origen natural, péptidos pequeños o hidroxiaácidos pegilados, y sales de tales ésteres y amidas,

5 y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono,

y en el que la respuesta es de un cáncer en un sujeto, y el biomarcador fosfo-Akt se mide *ex vivo* en una muestra o muestras tomadas del cuerpo animal, preferiblemente tomadas del cuerpo humano.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en el compuesto de fórmula general (I),

R representa fenilo o piridinilo

10 en donde fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo inferior, alcoxi inferior, amino, acetilamino, halógeno y nitro;

y en donde piridinilo está opcionalmente sustituido con amino o halógeno;

X representa un grupo C=O;

R¹ representa hidrógeno o ciano-alquilo inferior;

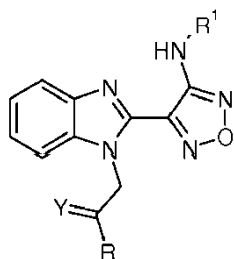
15 R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno;

o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo según se define en la reivindicación 1,

y en donde el prefijo inferior designa un radical que tiene hasta e incluye un máximo de 7, especialmente hasta e incluye un máximo de 4 átomos de carbono.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el compuesto se representa por la siguiente fórmula

20

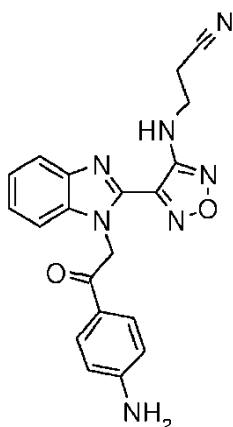


en donde R, Y y R¹ se definen como sigue:

R	Y	R1
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN

o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en la reivindicación 1.

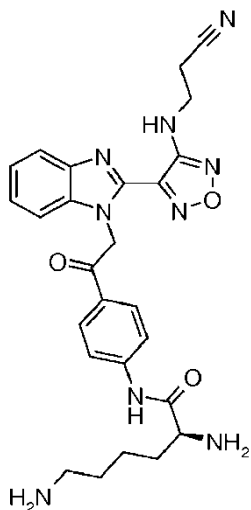
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es



o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en la reivindicación 1.

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el derivado es un pro-fármaco, que es una amida del compuesto de fórmula general (I) y que se forma a partir de un grupo amino presente dentro del grupo R del compuesto de fórmula general (I) según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y el grupo carboxi de glicina, alanina o lisina.

6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el compuesto es



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente una sal hidrocioruro del mismo, lo más preferiblemente una sal dihidrocioruro del mismo.

7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para predecir la resistencia de un cáncer en un sujeto a dicho compuesto.

8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la fosfo-Akt es Akt1 (SEQ. ID. NO. 1), Akt2 (SEQ. ID. NO. 2) o Akt3 (SEQ. ID. NO. 3) que se ha fosforilado en el siguiente residuo de serina:

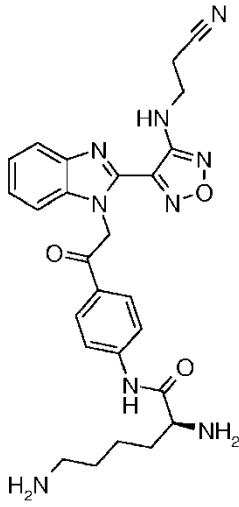
15 para Akt1 (SEQ. ID. NO. 1): S473;

para Akt2 (SEQ. ID. NO. 2): S474; y

para Akt3 (SEQ. ID. NO. 3): S472.

20 9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer neuroendocrino, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, tumores malignos hematológicos, melanoma y sarcomas.

10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y melanoma.
- 5 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y melanoma.
12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde una concentración elevada de fosfo-Akt en la muestra del sujeto con relación a un valor estándar o conjunto de valores estándar predice resistencia.
- 10 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde concentraciones más altas de fosfo-Akt en una muestra o muestras
- i) con respecto a un valor estándar o un conjunto de valores estándar de sujetos con el mismo histotipo del tumor; o
- ii) con relación a un valor estándar o un conjunto de valores estándar a partir de células o tejidos normales;
- 15 son predictivas de resistencia.
14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el biomarcador se utiliza para seleccionar sujetos que padecen cáncer, para el tratamiento con el compuesto de fórmula general (I) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 15. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la muestra se deriva de tejido tumoral, tejido normal, líneas celulares o células tumorales circulantes, preferiblemente en donde se deriva de tejido tumoral.
16. Un método para predecir la respuesta de un cáncer en un sujeto a un compuesto de fórmula general (I) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de:
- 25 a) medir una concentración *ex vivo* de fosfo-Akt, tal como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en una muestra pre-obtenida del sujeto para obtener un valor o valores que representan esta concentración; y
- b) comparar el valor o los valores de la etapa a) con un valor estándar o un conjunto de valores estándar de los sujetos con el mismo histotipo de cáncer,
- 30 en donde una concentración superior de fosfo-Akt en la muestra del sujeto en relación con el valor estándar o el conjunto de valores estándar predice la resistencia del cáncer del sujeto al compuesto de fórmula (I), y preferiblemente en donde el cáncer es un cáncer tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 u 11.
- 35 17. Un compuesto de fórmula general (I) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de un cáncer, en un ser humano aquejado de dicho cáncer, caracterizado por que el sujeto tiene una concentración de fosfo-Akt, tal como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 8, medida *ex vivo* en una muestra del sujeto que no es mayor que un valor estándar o conjunto de valores estándar de sujetos con el mismo histotipo de tumor.
- 40 18. Un kit para predecir la respuesta a un compuesto de fórmula (I) general o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende reactivos necesarios para medir la concentración de fosfo-Akt, tal como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en una muestra tomada de un sujeto con cáncer, y que comprende, además, un módulo de comparador que comprende un valor estándar o un conjunto de valores estándar de muestras de tejido tumoral o células tumorales circulantes de sujetos con un cáncer del mismo histotipo con el que se compara la concentración de fosfo-Akt en la
- 45 muestra, en donde el kit comprende un compuesto de la siguiente fórmula
19. El kit de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en particular la sal dihidrocloruro.

Figura 1

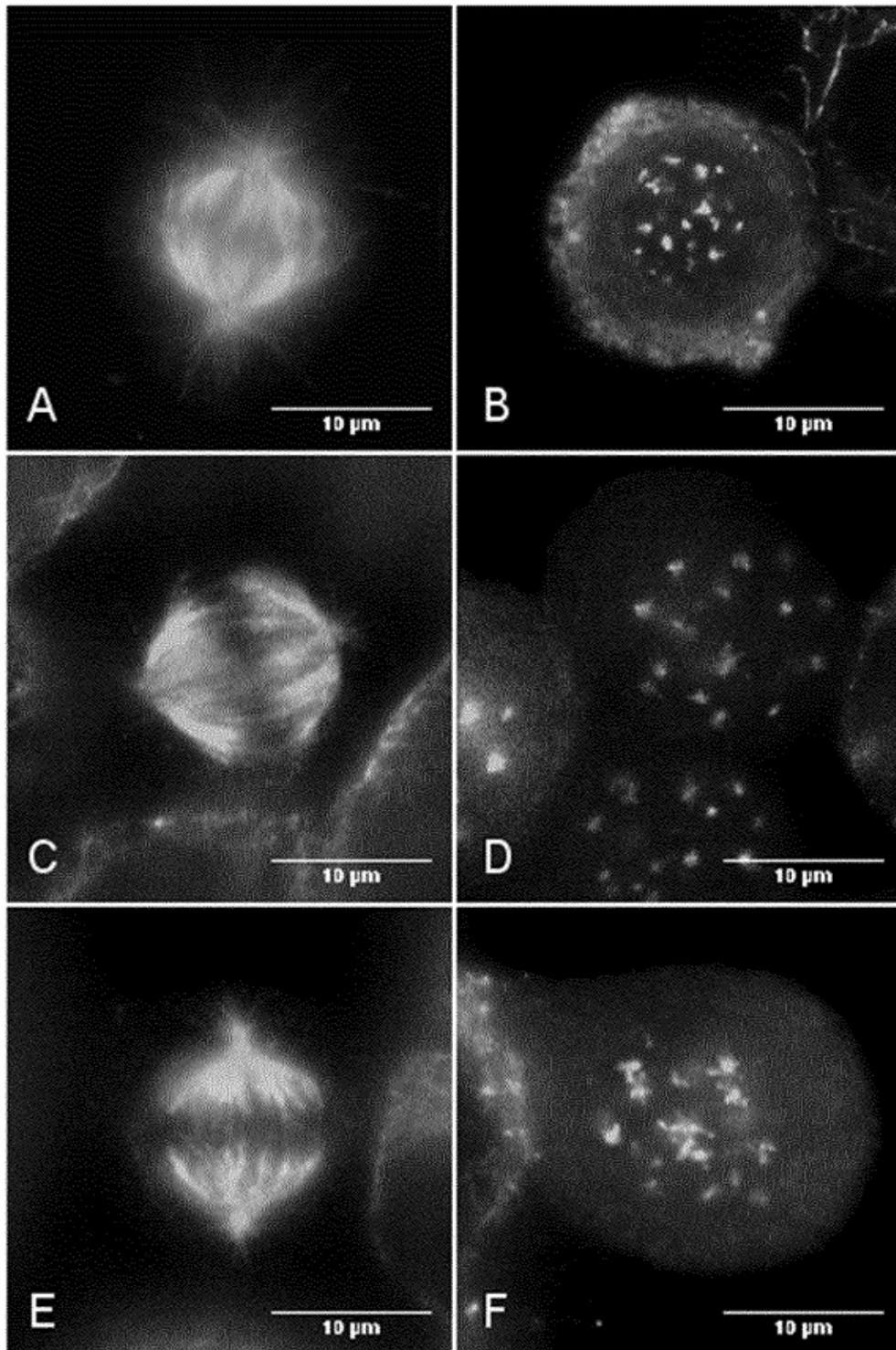


Figura 2

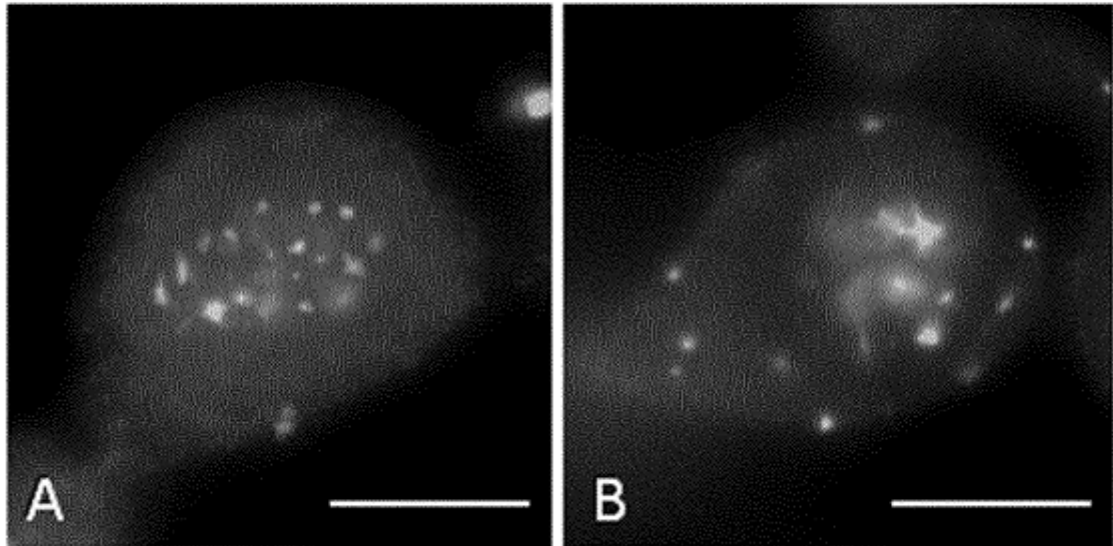


Figura 3

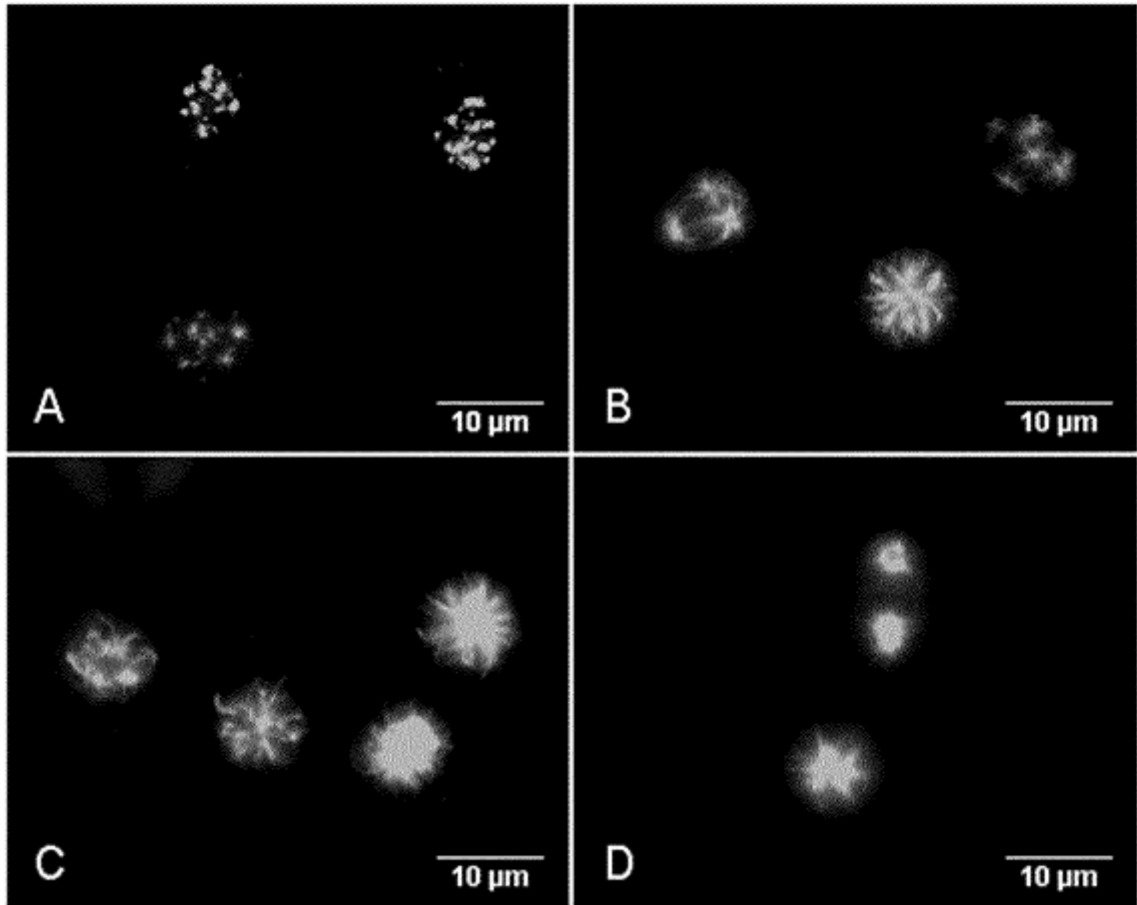


Figura 4

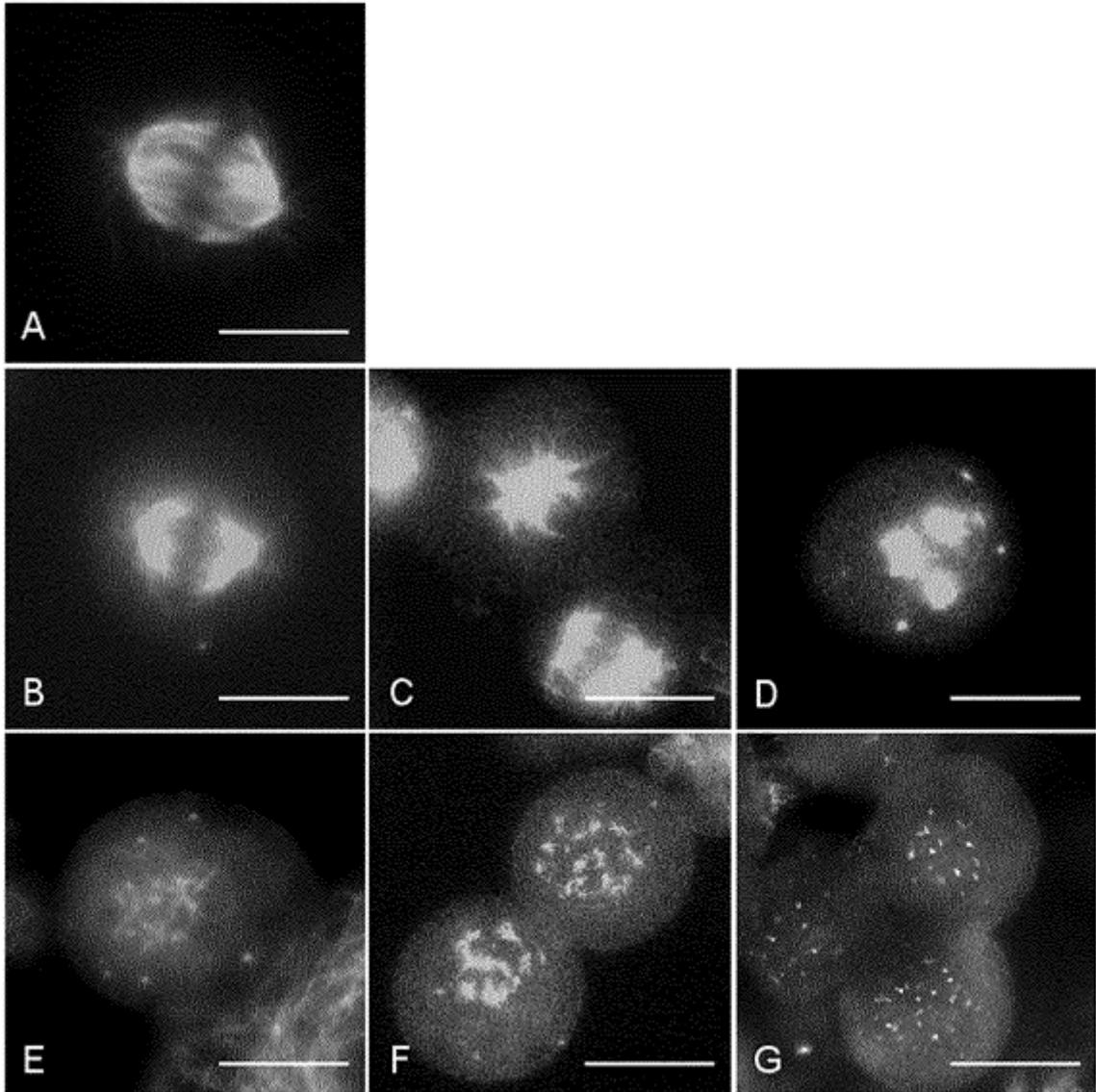


Figura 5

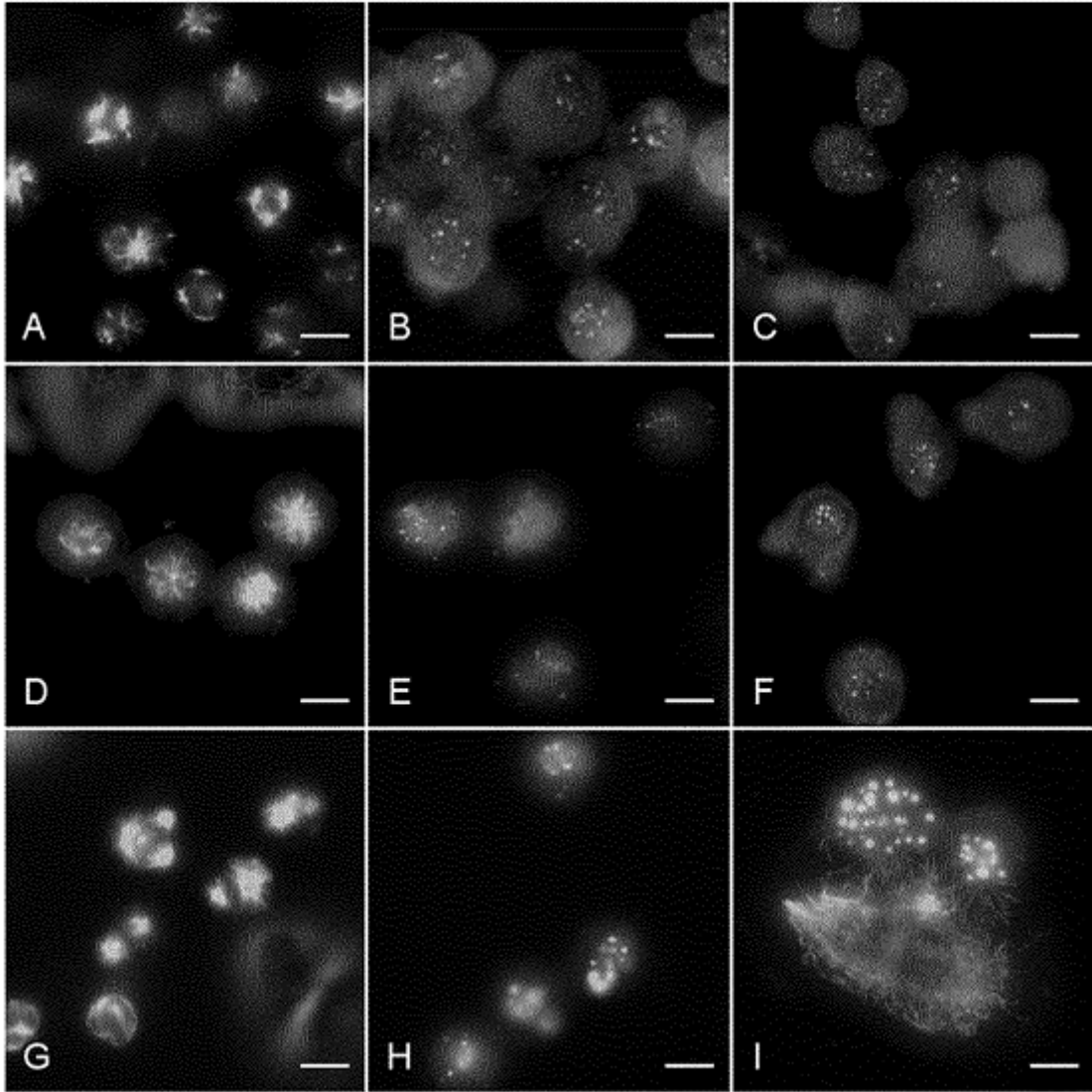


Figura 6

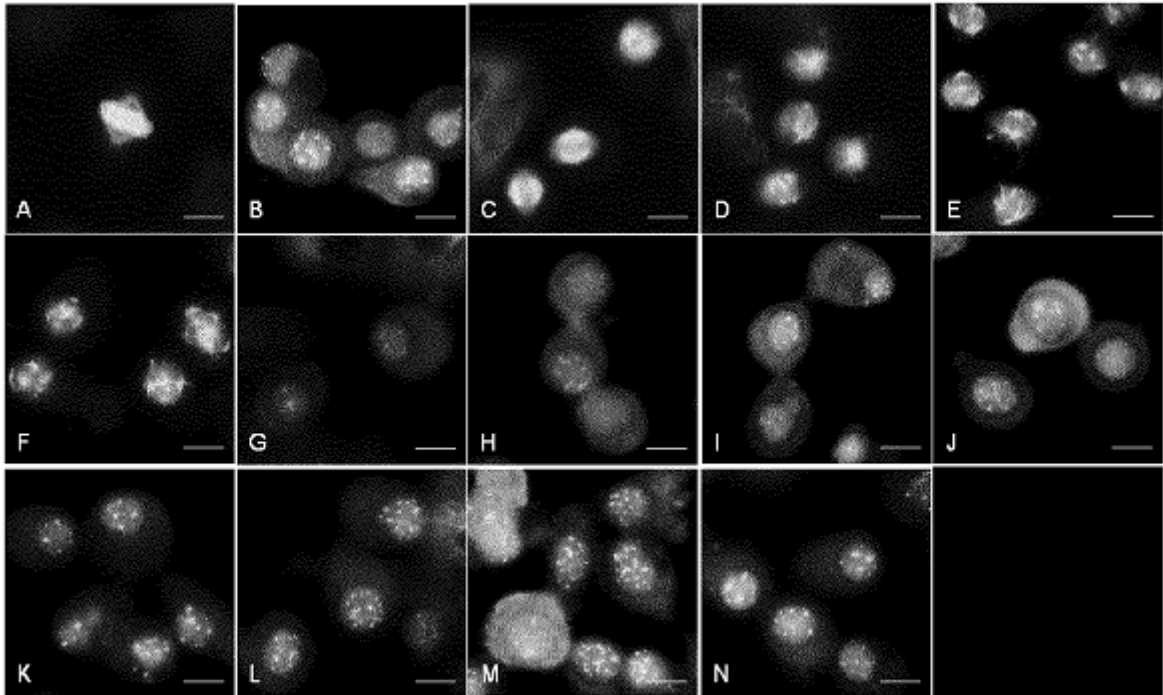


Figura 7

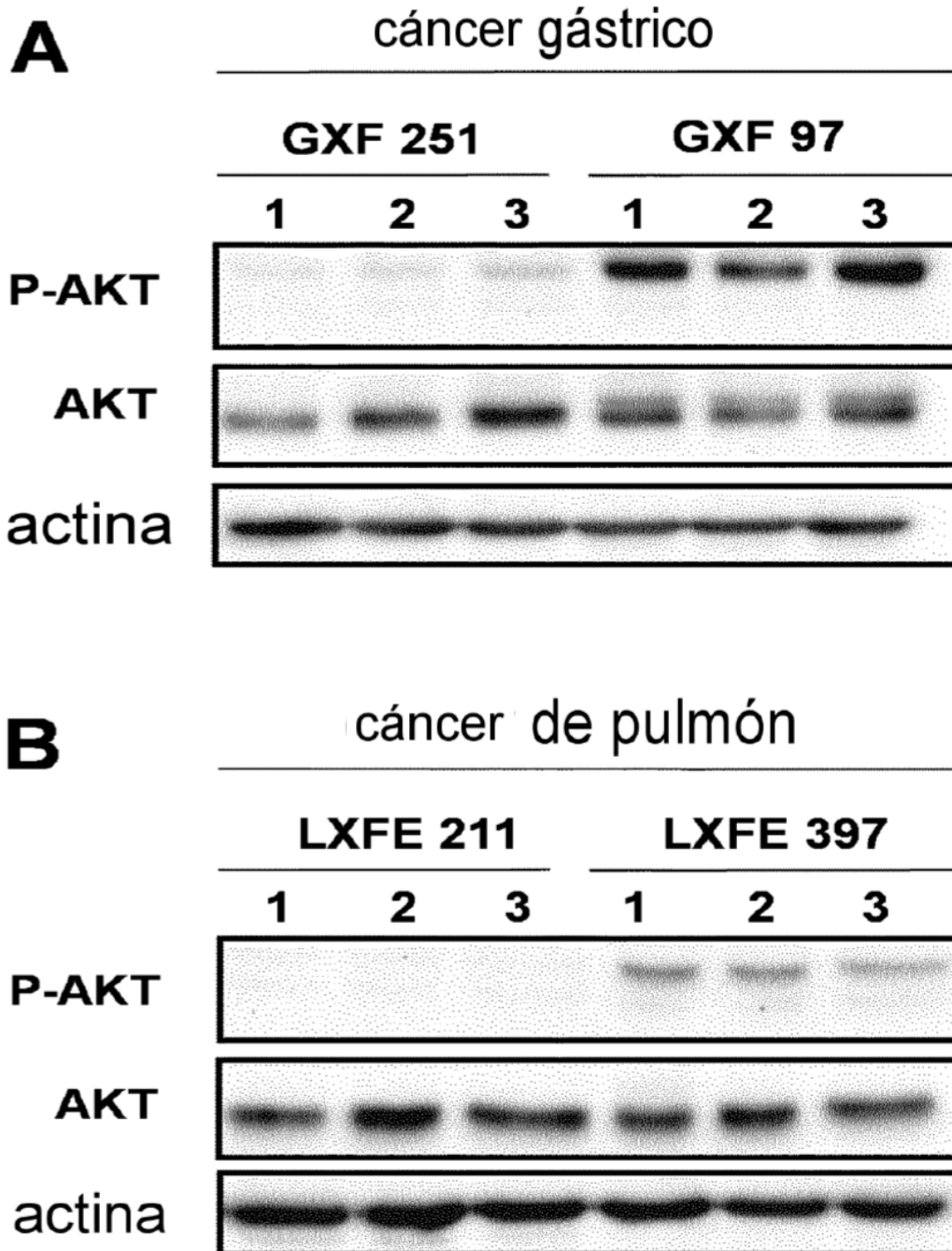


Figura 7

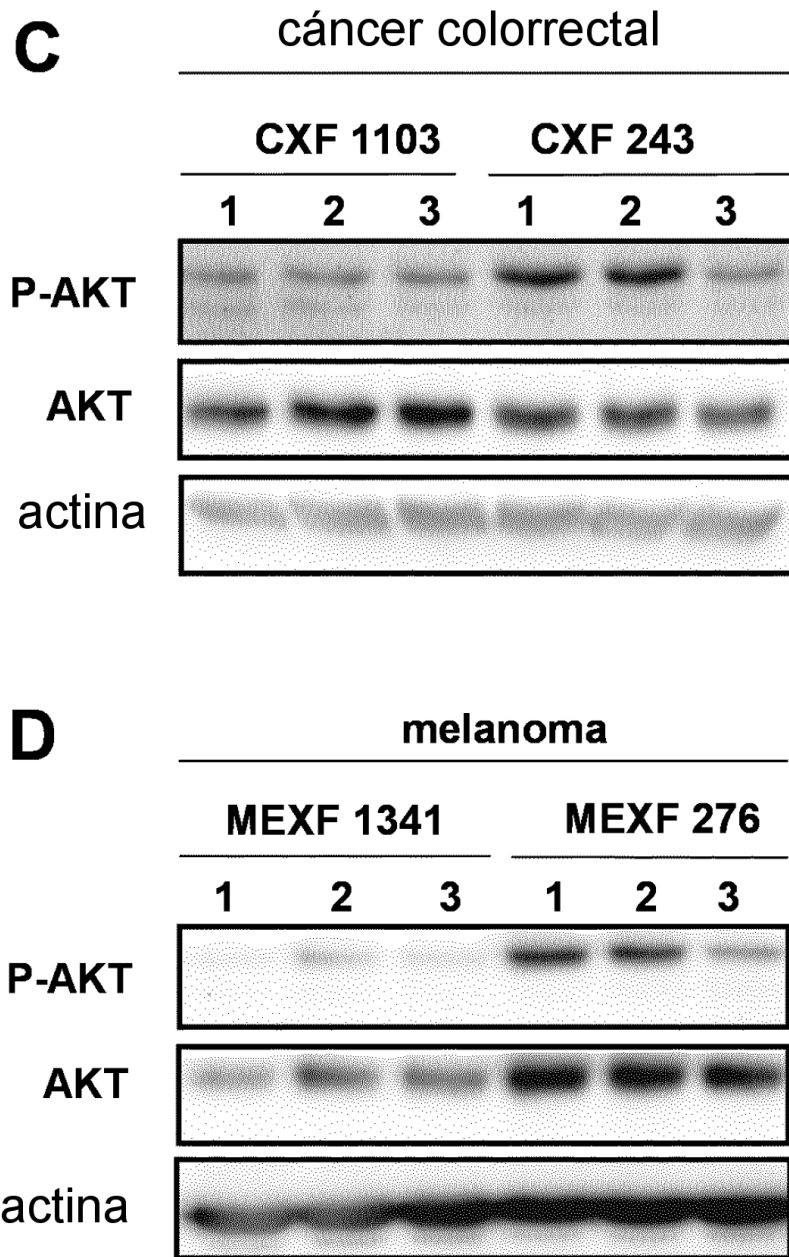


Figura 8

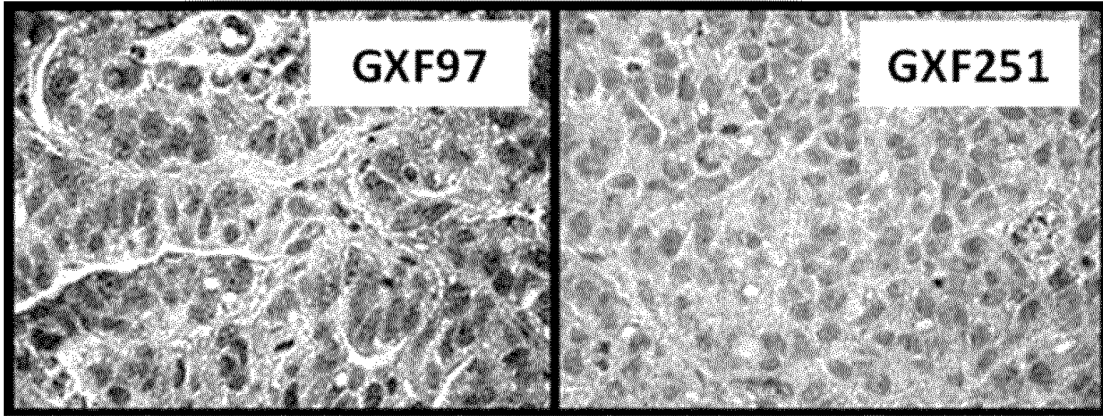


Figura 9

Akt1 (serina/treonina-proteína cinasa RAC-alfa)

[Homo sapiens] (SEQ. ID. No. 1)

```

1 msdvaivkeg wlhkrgeyik twrpryflk ndgtfigyke rpqdvqdrea plnnfsvaqc
61 qlmkterprp ntfiirclqw ttviertfhv etpeereewt taiqtvadgl kkqeeeeemdf
121 rsgspsdng aeemevslak pkhrvtmnef eylklkgkt fgkvlvkek atgryyamki
181 lkkevivakd evahtltenr vlqnsrhpfl talkysfqth drlcfvmeya nggelffhls
241 rervfsedra rfygaeivsa ldylhseknv vyrdlklenl mldkdghiki tdfglckegi
301 kdgatmktfc gtpeylapev ledndygrav dwwgglgvmy emmcgrlpfy nqdehklfel
361 ilmeeirfpr tlgpeaksll sglkkdkpkq rlggsedak eimqhrffag ivwqhvyekk
421 lspfpkpqvt setdryfde ehtaqmitit ppdqddsmec vdserrphfp qfsysasgta

```

Figura 10

Akt2 (serina/treonina-proteína cinasa RAC-beta) [Homo sapiens] (SEQ. ID. No. 2)

```

1 mnevsikeg wlhkrgeyik twrpryflk sdgsfigyke rpeapdqtlp plnnfsvaec
61 qlmkterprp ntfvirclqw ttviertfhv dspdereewm raiqmvanl kqrappedpm
121 dykcgspds stteemevav skarakvtm dfdyklkgk gtfkvlvr ekatgryyam
181 kilrkeviia kdevahtvte srvlqnrhp fltalkyafq thdrclfvme yanggelffh
241 lsrervftee rarfygaeiv saleylhsrd vvyrdiklen lmlkdghik itdfglckeg
301 isdgatmktf cgtpeylape vledndygra vdwwglgvmy yemmcgrlpf yndherlfe
361 lilmeeirfp rtilspeaksll lagllkkdpk qrlggggsda kevmehrrfl sinwqdvvpq
421 kllppfpqvt tsevdtryfd dehtaqsiti tppdrydsg lleldqrthf pqfsysasir
481 e

```

Figura 11

Akt3 isoforma 1 (serina/treonina-proteína cinasa RAC-gamma, isoforma 1) [Homo sapiens] (SEQ. ID. No. 3)

```

1 msdvtivkeg wvqkrgeyik nwrpryflk tdgsfigyke kpqdvdlpyp lnnfsvakcq
61 lmkterpkpn tfiirclqwt tviertfhvd tpeereewte aiqavadrlq rqeermncs
121 ptsqidnige eemdastthh krktmndfdy lkllkgkgtfg kvilvrekas gkyamkilk
181 keviiakdev ahtltesrvl kntrhpflts lkysfqtodr lcfvmevng gelffhlsre
241 rvfsedrtrf ygaeivsald ylhsgkivyr dlklenlml kdghikitdf glckegitda
301 atmktfcgtp eylapevled ndygravdww glgvmyemm cgrlpfyndq heklfelilm
361 edikfprtls sdaksllsgl likdpnkrlg ggpddakeim rhsffsgvnw qdvdykklvp
421 pfpkpqvtset dtryfdeeft aqtititppe kydedgmcm dnerrphfpq fsysasgre

```