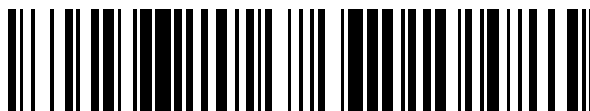


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 659**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2011** **PCT/US2011/023524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011** **WO11097333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2011** **E 11740321 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 2531194**

54 Título: **Identificación de mutación en LKB1 como un biomarcador predictivo para la sensibilidad a inhibidores de la quinasa TOR**

30 Prioridad:

09.07.2010 US 362982 P

03.02.2010 US 301150 P

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

31.05.2018

73 Titular/es:

SIGNAL PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)

10300 Campus Point Drive, Suite 100

San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

SANKAR, SABITA;

CHOPRA, RAJESH;

XU, WEIMING;

NING, YUHONG y

XU, SHUICHAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 670 659 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

Identificación de mutación en LKB1 como un biomarcador predictivo para la sensibilidad a inhibidores de la quinasa TOR

2. Campo

5 La presente invención se refiere a un inhibidor de la quinasa TOR para uso en un método para tratar carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el método comprende administrar el inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers caracterizado por una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

10 Se refiere además a un método para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers responda a terapia con inhibidor de la quinasa TOR, que comprende cribar el carcinoma del paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, el cáncer del paciente que tiene cáncer del cuello uterino o el paciente que tiene el Síndrome de Peutz-Jeghers para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje, en el que la presencia de la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 predice una probabilidad incrementada de que la terapia con el inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

15 La invención también se refiere a un kit que comprende uno o más contenedores llenos con (a) un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de éste, (b) reactivos para detectar una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje, en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un Síndrome tumoral y (c) instrucciones para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

20 Relacionado adicionalmente con la invención es un inhibidor de la quinasa TOR para uso en un método para tratar carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el método comprende administrar el inhibidor de la quinasa TOR y uno o más agentes seleccionados de 2-desoxiglucosa, metformina, fenformina y pemetrexed a un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

25 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la quinasa TOR, uno o más agentes seleccionados de 2-desoxiglucosa, metformina, fenformina y pemetrexed y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

30 En la presente memoria se describen métodos para tratar y/o prevenir un cáncer o un síndrome tumoral en un paciente, que comprende administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que tiene cáncer o un síndrome tumoral, caracterizado por una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y/o AMPK

3. Antecedentes

35 Desde hace más de 20 años se ha sabido la conexión entre la fosforilación anormal de proteínas y la causa o consecuencia de enfermedades. De acuerdo con esto, las proteínas quinasas se han convertido en un grupo muy importante de dianas de fármacos. Véase Cohen, *Nat. Rev. Drug Disc.*, 1:309-315 (2002), Grimmiger et al. *Nat. Rev. Drug Disc.* 9(12):956-970 (2010). Se han usado clínicamente varios inhibidores de proteínas quinasas en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, tales como cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo diabetes e ictus. Véase, Cohen, *Eur. J. Biochem.*, 268:5001-5010 (2001), *Protein Kinase Inhibitors for the Treatment of Disease: The Promise and the Problems, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer Berlin Heidelberg, 167 (2005).

40 Las proteínas quinasas pertenecen a una familia grande y diversa de enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas y juegan un papel crítico en la señalización celular. Las proteínas quinasas pueden ejercer efectos reguladores positivos o negativos, dependiendo de su proteína diana. Las proteínas quinasas están implicadas en rutas de señalización específicas que regulan funciones celulares tales como, pero no limitadas a, metabolismo,

progresión del ciclo celular, adhesión celular, función vascular, apoptosis y angiogénesis. El funcionamiento defectuoso de la señalización celular se ha asociado con muchas enfermedades, de las que las más caracterizadas incluyen el cáncer y la diabetes. Está bien documentada la regulación de la transducción celular por citoquinas y la asociación de moléculas de señalización con protooncogenes y genes supresores de tumores. De forma similar, se ha demostrado la conexión entre la diabetes y afecciones relacionadas y los niveles desregulados de proteínas quinasas. Véase, por ejemplo, Sridhar *et al. Pharm. Res.* 17(11):1345-1353 (2000). Las infecciones virales y las afecciones relacionadas con estas también se han asociado con la regulación de las proteínas quinasas. Park *et al. Cell* 101(7): 777-787 (2000).

Las proteínas quinasas pueden dividirse en grupos amplios sobre la base de la identidad del o de los aminoácidos frente a los que están dirigidas (serina/treonina, tirosina, lisina e histidina). Por ejemplo, las tirosinas quinasas incluyen tirosinas quinasas de receptores (RTK), tales como factores de crecimiento y tirosinas quinasas no de receptores, tales como la familia de la quinasa src. También hay proteínas quinasas de especificidad dual que están dirigidas tanto a tirosina como a serina/treonina, tales como las quinasas dependientes de ciclina (CDK) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Como las proteínas quinasas regulan casi todos los procesos celulares, incluyendo metabolismo, proliferación celular, diferenciación celular y supervivencia celular, son dianas atractivas para la intervención terapéutica para varios estados de enfermedad. Por ejemplo, el control del ciclo celular y la angiogénesis, en los que las proteínas quinasas juegan un papel crucial son procesos celulares asociados con numerosas afecciones de enfermedad tales como, pero no limitadas a, cáncer, enfermedades inflamatorias, angiogénesis anormal y enfermedades relacionadas con esta, aterosclerosis, degeneración macular, diabetes, obesidad y dolor.

Las proteínas quinasas se han convertido en dianas atractivas para el tratamiento de cánceres. Fabbro *et al. Pharm. Ther.* 93:79-98 (2002). Se ha propuesto que la implicación de las proteínas quinasas en el desarrollo de malignidades humanas puede ocurrir por: (1) reorganizaciones genómicas (p. ej., BCR-ABL en leucemia mielógena crónica), (2) mutaciones que dan lugar a actividad quinasa constitutivamente activa, tal como leucemia mielógena aguda y tumores gastrointestinales, (3) desregulación de la actividad quinasa por la activación de oncogenes o pérdida de funciones supresoras de tumores, tal como en cánceres con RAS oncogénico, (4) desregulación de la actividad quinasa por sobreexpresión, tal como en el caso de EGFR y (5) expresión ectópica de factores de crecimiento que pueden contribuir al desarrollo y mantenimiento del fenotipo neoplásico. Fabbro *et al., Pharm. Ther.* 93:79-98 (2002).

La elucidación de la complicación de las rutas de proteínas quinasas y la complejidad de la relación e interacción entre las distintas proteínas quinasas y rutas de quinasas resalta la importancia de desarrollar agentes farmacéuticos capaces de actuar como moduladores, reguladores o inhibidores de proteínas quinasas que tengan una actividad beneficiosa sobre múltiples quinasas o múltiples rutas de quinasas. De acuerdo con esto, permanece una necesidad de nuevos moduladores de quinasas.

La proteína denominada mTOR (diana en mamíferos de la rapamicina), también denominada FRAP, RAFTI o RAPT1), es una proteína quinasa de Ser/Thr de 2.549 aminoácidos, que se ha mostrado que es una de las proteínas más críticas en la ruta mTOR/PI3K/Akt que regula el crecimiento y la proliferación celulares. Georgakis y Younes *Expert Rev. Anticancer Ther.* 6(1):131-140 (2006). mTOR existe en dos complejos, mTORC1 y mTORC2. Mientras mTORC1 es sensible a análogos de rapamicina (tales como temsirolimus o everolimus), mTORC2 es muy insensible a rapamicina. Notablemente, la rapamicina no es un inhibidor de la quinasa TOR. Varios inhibidores de mTOR han sido o están siendo evaluados en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer. El temsirolimus se aprobó para uso en carcinoma de células renales en 2007 y el everolimus se aprobó en 2009 para pacientes con carcinoma de células renales que habían progresado con tratamiento con inhibidores del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular. Además, el sirolimus se aprobó en 1999 para la profilaxis del rechazo de trasplante renal. El éxito clínico interesante pero limitado de estos compuestos inhibidores de mTORC1 demuestra la utilidad de los inhibidores de mTOR en el tratamiento del cáncer y rechazo de trasplantes y el potencial creciente de compuestos con actividad inhibidora tanto de mTORC1 como de mTORC2.

Las mutaciones somáticas afectan a rutas clave en el cáncer de pulmón. De acuerdo con esto, la identificación de mutaciones específicas asociadas con el cáncer de pulmón puede dar lugar a protocolos terapéuticos mejorados. Estudios recientes han descubierto un gran número de mutaciones somáticas del gen LKB1 que están presentes en el cáncer de pulmón, del cuello uterino, de mama, intestinal, testicular, pancreático y de piel (Distribution of somatic mutations in STK11, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge).

La citación o identificación de cualquier referencia en la Sección 2 de esta solicitud no debe considerarse como una admisión de que la referencia es técnica anterior a la presente solicitud

4. Resumen

La presente invención se refiere a un inhibidor de la quinasa TOR para uso en un método para tratar carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el método comprende administrar el inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no

pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers caracterizado por una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

- 5 Se refiere además a un método para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers responda a terapia con inhibidor de la quinasa TOR, que comprende cribar el carcinoma del paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, el cáncer del paciente que tiene cáncer del cuello uterino o el paciente que tiene el Síndrome de Peutz-Jeghers para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje,
- 10 en el que la presencia de la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 predice una probabilidad incrementada de que la terapia con el inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.
- 15 La invención también se refiere a un kit que comprende uno o más contenedores llenos con (a) un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de éste, (b) reactivos para detectar una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje, en el cáncer de un paciente que tiene un síndrome tumoral y (c) instrucciones para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal,
- 20 clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

Relacionado adicionalmente con la invención es un inhibidor de la quinasa TOR para uso en un método para tratar carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el método comprende administrar el inhibidor de la quinasa TOR y uno o más agentes seleccionados de 2-desoxiglucosa, metformina, fenformina y pemetrexed a un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal,

25 clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la quinasa TOR, uno o más agentes seleccionados de 2-desoxiglucosa, metformina, fenformina y pemetrexed y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal,

30 clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de éste farmacéuticamente aceptable.

En la presente memoria se describen métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprende administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que tiene un cáncer o un síndrome tumoral caracterizado por una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje.

35

En la presente memoria se describen además métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden cribar el cáncer de un paciente para detectar la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje y administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR al paciente que tiene un cáncer caracterizado por la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1.

40

En la presente memoria se describen además métodos para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer de un paciente ("paciente de ensayo"), por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprende: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión del ARNm de LKB1, el nivel de la expresión de la proteína LKB1, determinar el estado de metilación del gen LKB1 o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína (p. ej., por secuenciación directa del ADN o de ADN exónico o análisis SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida en el número de copias, o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF) o transferencia Western para determinar la pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 (tipo salvaje); en el que un cambio en la expresión del ARNm de LKB1, expresión de la proteína LKB1, estructura del ARNm de LKB1, estado de metilación del gen LKB1 y/o estructura de la proteína LKB1 en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al del paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el

45

50

55

cáncer del paciente de ensayo.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, responda a

terapia con inhibidor de la quinasa TOR, que comprende cribar el cáncer de dicho paciente para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 predice una probabilidad incrementada de que la terapia con inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho cáncer.

- 5 En la presente memoria se describen además métodos para predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden cribar el cáncer de dicho paciente para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer del paciente es predictiva de la
10 eficacia terapéutica del tratamiento con un inhibidor de la quinasa TOR.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, el Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden cribar el paciente para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 respecto al de un paciente control o de tipo salvaje y administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR al paciente que tiene la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1.

- 15 En la presente memoria se describen además métodos para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en un paciente ("paciente de ensayo") que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden: obtener una muestra biológica del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión del ARNm de LKB1, el nivel de la expresión de la proteína LKB1, determinar el estado de metilación del gen LKB1 o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína (p. ej., por
20 secuenciación directa del ADNc o de ADN exónico o análisis SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida en el número de copias, o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF) o transferencia Western para determinar la pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control de un paciente ("paciente control") sin la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 (tipo salvaje); en el que un cambio en la expresión del ARNm de LKB1, expresión de la proteína LKB1, estructura del ARNm de LKB1, estado de metilación del gen LKB1 y/o estructura de la proteína LKB1 en la
25 muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al del paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el paciente de ensayo.

- En la presente memoria se proporcionan además métodos para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, responda a terapia con inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden cribar a dicho paciente para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o
30 proteína LKB1 respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 predice una probabilidad incrementada de que la terapia con inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho síndrome tumoral.

- En la presente memoria se describen además métodos para predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden cribar a dicho paciente para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o
35 proteína LKB1 respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el paciente es predictiva de la eficacia terapéutica del tratamiento con un inhibidor de la quinasa TOR.

- 40 En la presente memoria se describen métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que tiene un cáncer o un síndrome tumoral caracterizado por la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje.

- 45 En la presente memoria se describen métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que tiene un cáncer o un síndrome tumoral caracterizado por un nivel reducido de proteína fosfo-AMPK (pAMPK) y/o actividad de AMPK respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En una realización, la pAMPK es pAMPK
50 T172.

- En la presente memoria se describen además métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden cribar el cáncer de un paciente para detectar la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK respecto al de un paciente control o de tipo salvaje y administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR al paciente que tiene un cáncer
55 caracterizado por la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK.

En la presente memoria se describen además métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden cribar el cáncer de un paciente para detectar la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK respecto al de un paciente control o de tipo salvaje y administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR al paciente

que tiene un cáncer caracterizado por un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK. La pAMPK puede ser pAMPK T172.

En la presente memoria se describen además métodos para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK en el cáncer de un paciente ("paciente de ensayo"), por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión del ARNm de AMPK, el nivel de la expresión de la proteína AMPK, determinar el estado de metilación del gen AMPK o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína (p. ej., por secuenciación directa del ADNc o de ADN exónico o análisis SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida en el número de copias, o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF) o transferencia Western para determinar la pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por una pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK (tipo salvaje); en el que un cambio en la expresión del ARNm de AMPK, expresión de la proteína AMPK, estructura del ARNm de AMPK, estado de metilación del gen AMPK y/o estructura de la proteína AMPK en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al del paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK en el cáncer del paciente de ensayo.

En la presente memoria se describen además métodos para detectar un nivel reducido de la proteína AMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer de un paciente ("paciente de ensayo"), por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión de la proteína pAMPK, el nivel de la actividad de AMPK o medir de otra manera el nivel de la proteína pAMPK (p. ej., inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF) o transferencia Western para determinar la cantidad de proteína pAMPK o la cantidad de fosforilación de AMPK en sitios específicos, por ejemplo, en el sitio T172) y/o el nivel de la actividad de AMPK (p. ej., ensayo de quinasa AMPK, véase Sanders *et al. Biochem.J.* 403:139-148 (2007)); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK (tipo salvaje); en el que un nivel más bajo de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer del paciente de ensayo.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, responda a terapia con inhibidor de la quinasa TOR, que comprende cribar el cáncer de dicho paciente para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK predice una probabilidad incrementada de que la terapia con un inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho cáncer.

En la presente memoria se describen además métodos para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, responda a terapia con inhibidor de la quinasa TOR, que comprende cribar el cáncer de dicho paciente para detectar la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK predice una probabilidad incrementada de que la terapia con un inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho cáncer.

En la presente memoria se describen además métodos para predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprende cribar el cáncer de dicho paciente para detectar la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de pérdida del gen o proteína AMPK en el cáncer del paciente es predictiva de la eficacia terapéutica del tratamiento con un inhibidor de la quinasa TOR.

En la presente memoria se describen además métodos para predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden cribar el cáncer de dicho paciente para detectar la presencia de nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer del paciente es predictiva de la eficacia terapéutica del tratamiento con un inhibidor de la quinasa TOR.

En la presente memoria se describen además métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR y una cantidad efectiva de uno o más agentes que modulan los niveles de AMP, captación de glucosa, metabolismo o una respuesta de estrés a un paciente que tiene cáncer o un síndrome tumoral.

En la presente memoria se describen además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más inhibidores de la quinasa TOR y uno o más agentes que modulan los niveles de AMP, captación de glucosa, metabolismo o una respuesta de estrés y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 5 En la presente memoria se proporcionan además kits que comprenden uno o más contenedores llenos con un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de este, reactivos para detectar pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, o pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK, o ambos, en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral e instrucciones para detectar pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, o pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK, o ambos, en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral.
- 10 En la presente memoria se describen además kits que comprenden uno o más contenedores llenos con un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de este, reactivos para detectar un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral e instrucciones para detectar un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral.
- 15 En algunas realizaciones, el inhibidor de la quinasa TOR es un compuesto como se describe en la presente memoria.

Las presentes realizaciones pueden comprenderse más completamente por referencia a la descripción detallada y los ejemplos, que se pretende que ejemplifiquen las realizaciones no limitantes.

5. Descripción breve de los dibujos

- 20 FIG 1A. La Figura 1 lista el estado de mutación de LKB1 de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), sobre la base de secuencias de ADN reportadas, la mutación reportada, la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de proteína LKB1 intacta (según se determina por inmunotransferencia Western como se muestra en la Fig. 1B) y valores CI_{50} medios (μM) para inhibición del crecimiento por el Compuesto 1 (n es el número de determinaciones replicadas de CI_{50}).
- 25 FIG 1B. La Figura 1B ilustra una transferencia Western LI-COR que muestra los niveles de proteína LKB1 a lo largo del panel de líneas celulares de NSCLC de la Fig. 1A. El experimento confirma la ausencia de proteína LKB1 para las líneas reportadas como mutantes del gen LKB1.
- FIG 2A. La Figura 2A ilustra la correlación de la sensibilidad frente al tratamiento con el inhibidor de la quinasa TOR, Compuesto 1 (CI_{50}) con el estado de mutación del gen LKB1 reportado, según se determina por el ensayo de
- 30 Kruskal ($p = 0,0296$).
- FIG 2B. La Figura 2B ilustra la correlación de la sensibilidad frente al tratamiento con el inhibidor de la quinasa TOR, Compuesto 1 (CI_{50}) con la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de proteína LKB1 según se evalúa por inmunotransferencia Western LI-COR, según se determina por el ensayo de Wilcoxon ($p = 0,0128$).
- FIG 2C. La Figura 2C ilustra la aplicación del ensayo de Fisher y del ensayo de Wilcoxon para analizar la correlación
- 35 entre la sensibilidad para el Compuesto 1 (definida como $CI_{50} < 5 \mu M$) y la presencia o ausencia de proteína LKB1 intacta (según se determina por inmunotransferencia Western). Los valores p resultantes indican que las líneas celulares sin proteína LKB1 intacta son más sensibles al Compuesto 1.
- FIG 3A. La Figura 3A ilustra una transferencia Western LI-COR que muestra los niveles de fosfo-AMPK T172, AMPK, LKB1 y actina de líneas celulares de NSCLC seleccionadas. Los niveles de la proteína LKB1 se correlacionan con los niveles de pAMPK T172 excepto para H1437.
- 40 FIG 3B. La Figura 3B ilustra el resultado de la aplicación del ensayo de Wilcoxon para analizar la correlación entre el estado de LKB1 y la relación pAMPK/actina en cuarenta y dos líneas celulares de NSCLC. El estado de LKB1 se definió bien como negativo o positivo sobre la base de la inmunotransferencia Western. El eje de las y es el $\log_{10}$ de la relación pAMPK/actina. La correlación entre el estado de la proteína LKB1 y la relación pAMPK/actina se evaluó
- 45 usando el ensayo de Wilcoxon ($p = 0,000278$), en el que un valor $p < 0,05$ se considera como una correlación significativa.

6. Descripción detallada

6.1 Definiciones

- 50 Un grupo "alquilo" es un hidrocarburo no cíclico saturado, parcialmente saturado o insaturado de cadena lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, típicamente de 1 a 8 carbonos o, en algunas realizaciones, de 1 a 6, 1 a 4, o 2 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo representativos incluyen -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo y n-hexilo; mientras los alquilos saturados ramificados incluyen -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo y semejantes. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no están limitados a, vinilo, alilo, $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, -

$C(CH_3)=CH_2$, $-C(CH_3)=CH(CH_3)$, $-C(CH_2CH_3)=CH_2$, $-C\equiv CH$, $-C\equiv C(CH_3)$, $-C\equiv C(CH_2CH_3)$, $-CH_2C\equiv CH$, $-CH_2C\equiv C(CH_3)$ y $-CH_2C\equiv C(CH_2CH_3)$, entre otros. Un grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. A no ser que se indique otra cosa, cuando los grupos alquilo descritos en la presente memoria se dice que están "sustituidos", pueden estar sustituidos con cualquier sustituyente o sustituyentes como los encontrados en los compuestos y realizaciones ejemplares descritas en la presente memoria, así como halógeno (cloro, yodo, bromo o flúor); alquilo; hidroxilo; alcoxi; alcoxialquilo; amino; alquilamino; carboxi; nitro; ciano; tiol; tioéter; imina; imida; amidina; guanidina; enamina; aminocarbonilo; acilamino; fosfonato; fosfina; tiocarbonilo; sulfonilo; sulfona; sulfonamida; cetona; aldehído; éster; urea; uretano; oxima; hidroxil amina; alcoxiamina; aralcoxiamina; N-óxido; hidrazina; hidrazida; hidrazona; azida; isocianato; isotiocianato; cianato; tiocianato; oxígeno (=O); B(OH)₂ u O(alquil)aminocarbonilo.

Un grupo "alquenilo" es un hidrocarburo no cíclico de cadena lineal o ramificado que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, típicamente de 2 a 8 átomos de carbono, y que incluye al menos un doble enlace carbono-carbono. Los alquenilos (C₂-C₈) de cadena lineal y ramificados representativos incluyen -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, -1-hexenilo, -2-hexenilo, -3-hexenilo, -1-heptenilo, -2-heptenilo, -3-heptenilo, -1-octenilo, -2-octenilo, -3-octenilo y semejantes. El doble enlace de un grupo alquenilo puede no estar conjugado o estar conjugado con otro grupo insaturado. Un grupo alquenilo puede no estar sustituido o estar sustituido.

Un grupo "cicloalquilo" es un grupo alquilo cíclico saturado, parcialmente saturado o insaturado de 3 a 10 átomos de carbono que tiene un único anillo cíclico o múltiples anillos condensados o con puente que pueden estar sustituidos opcionalmente con de 1 a 3 grupos alquilo. En algunas realizaciones, el grupo cicloalquilo tiene 3 a 8 miembros en el anillo, mientras, en otras realizaciones, el número de átomos de carbono en el anillo varía de 3 a 5, 3 a 6 o 3 a 7. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, como ejemplo, estructuras de anillo único tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, 1-metilciclopropilo, 2-metilciclopentilo, 2-metilciclooctilo y semejantes, o estructuras de anillos múltiples o con puente tales como adamantilo y semejantes. Los ejemplos de grupos cicloalquilo insaturados incluyen ciclohexenilo, ciclopentenilo, ciclohexadienilo, butadienilo, pentadienilo, hexadienilo, entre otros. Un grupo cicloalquilo puede estar sustituido o no sustituido. Dichos grupos cicloalquilo sustituidos incluyen, como ejemplo, ciclohexanona y semejantes.

Un grupo "arilo" es un grupo carbocíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono que tiene un único anillo (p. ej. fenilo) o múltiples anillos condensados (p. ej., naftilo o antrilo). En algunas realizaciones, los grupos arilo contienen 6-14 carbonos y, en otras, de 6 a 12 o también 6 a 10 átomos de carbono en las partes de anillo de los grupos. Los arilos particulares incluyen fenilo, bifenilo, naftilo y semejantes. Un grupo arilo puede estar sustituido o no sustituido. La expresión "grupos arilo" también incluye grupos que contienen anillos fusionados, tales como sistemas de anillos aromáticos-alifáticos fusionados (p. ej., indanilo, tetrahidronaftilo y semejantes).

Un grupo "heteroarilo" es un sistema de anillo arilo que tiene uno a cuatro heteroátomos como átomos del anillo en un sistema de anillos heteroaromático, en el que el resto de los átomos son átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos heteroarilo contienen 5 a 6 átomos en el anillo y, en otras, de 6 a 9 o también 6 a 10 átomos en las partes de anillo de los grupos. Los heteroátomos adecuados incluyen oxígeno y nitrógeno. En determinadas realizaciones, el sistema de anillo heteroarilo es monocíclico o bicíclico. Los ejemplos no limitantes incluyen, pero no están limitados a, grupos tales como los grupos pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, pirolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, tiofenilo, benzotiofenilo, furanilo, benzofuranilo (por ejemplo, isobenzofuran-1,3-diimina), indolilo, azaindolilo (por ejemplo, pirrolopiridilo o 1H-pirrolo[2,3-b]piridilo), indazolilo, bencimidazolilo (por ejemplo, 1H-benzo[d]imidazolilo), imidazopiridilo (por ejemplo, azabencimidazolilo, 3H-imidazo[4,5-b]piridilo o 1H-imidazo[4,5-b]piridilo), pirazolopiridilo, triazolopiridilo, benzotriazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, isoxazolopiridilo, tianaftalenilo, purinilo, xantinilo, adeninilo, guaninilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, quinoxalinilo y quinazolinilo.

Un "heterociclilo" es un cicloalquilo aromático (también referido como heteroarilo) o no aromático en el que uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo se reemplaza independientemente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. En algunas realizaciones, los grupos heterociclilo incluyen 3 a 10 miembros en el anillo, mientras otros de dichos grupos tienen 3 a 5, 3 a 6 o 3 a 8 miembros en el anillo. Los heterociclicos también pueden estar unidos a otros grupos en cualquier átomo del anillo (es decir, en cualquier átomo de carbono o heteroátomo del anillo heterocíclico). Un grupo heterociclilaquilo puede estar sustituido o no sustituido. Los grupos heterociclilo engloban sistemas de anillos insaturados, parcialmente saturados y saturados tales como, por ejemplo, los grupos imidazolilo, imidazolinilo e imidazolidinilo. La expresión heterociclilo incluye especies de anillos fusionados, incluyendo los que comprenden grupos aromáticos y no aromáticos fusionados, tales como, por ejemplo, benzotriazolilo, 2,3-dihidrobenczo[1,4]dioxinilo y benzo[1,3]dioxolilo. La expresión también incluye sistemas de anillos policíclicos con puente que contienen un heteroátomo tales como, pero no limitados a, quinuclidilo. Los ejemplos representativos de un grupo heterociclilo incluyen, pero no están limitados a, los grupos aziridinilo, azetidínilo, pirrolidilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrofuranilo, dioxolilo, furanilo, tiofenilo, pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, pirazolilo, pirazolinilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiazolinilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidropiranilo (por ejemplo, tetrahidro-2H-piranilo), tetrahidrotiopiranilo, oxatiano, dioxilo, ditianilo, piranilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, triazinilo, dihidropiridilo, dihidroditinilo, dihidroditinilo, homopiperazinilo, quinuclidilo, indolilo, indolinilo, isoindolilo, azaindolilo (pirrolopiridilo), indazolilo, indolizínilo, benzotriazolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo,

benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxadiazolilo, benzoxazinilo, benzoditiinilo, benzoxatiinilo, benzotiazinilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[1,3]dioxolilo, pirazolopiridilo, imidazopiridilo (azabencimidazolilo; por ejemplo, 1H-imidazo[4,5-b]piridilo o 1H-imidazo[4,5-b]piridin-2(3H)-onilo), triazolopiridilo, isoxazolopiridilo, purinilo, xantinilo, adeninilo, guaninilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinolizininilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, pteridinilo, tianaftalenilo, dihidrobenzotiazinilo, dihidrobenzofuranilo, dihidroindolilo, dihidrobenzodioxinilo, tetrahidroindolilo, tetrahidroindazolilo, tetrahidrobencimidazolilo, tetrahidrobenzotriazolilo, tetrahidropirrolopiridilo, tetrahidropirazolopiridilo, tetrahidroimidazopiridilo, tetrahidrotriazolopiridilo y tetrahidroquinolinilo. Los grupos heterocíclico sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez, tales como, pero no limitados a, los grupos piridilo o morfolinilo, que están sustituidos en 2, 3, 4, 5 o 6, o disustituidos con varios sustituyentes tales como los listados más adelante.

Un grupo "cicloalquilalquilo" es un radical de la fórmula: -alquil-cicloalquilo, en el que alquilo y cicloalquilo se han definido anteriormente. Los grupos cicloalquilalquilo sustituidos pueden estar sustituidos en el alquilo, el cicloalquilo, o tanto en la parte alquilo como cicloalquilo del grupo. Los grupos cicloalquilalquilo representativos incluyen, pero no están limitados a, ciclopentilmetilo, ciclopentiletilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo y ciclohexilpropilo. Los grupos cicloalquilalquilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o estar sustituidos más de una vez.

Un grupo "aralquilo" es un radical de la fórmula: -alquil-arilo, en el que alquilo y arilo se han definido anteriormente. Los grupos aralquilo sustituidos pueden estar sustituidos en el alquilo, el arilo o tanto en la parte alquilo como arilo del grupo. Los grupos aralquilo representativos incluyen, pero no están limitados a, los grupos bencilo y fenetilo y grupos (cicloalquilaryl)alquilo fusionados tales como 4-etil-indanilo.

Un grupo "heterocicliclalquilo" es un radical de la fórmula: -alquil-heterocíclico, en el que alquilo y heterocíclico se han definido anteriormente. Los grupos heterocicliclalquilo sustituidos pueden estar sustituidos en el alquilo, el heterocíclico o tanto en la parte alquilo como heterocíclico del grupo. Los grupos heterocicliclalquilo representativos incluyen, pero no están limitados a, 4-etil-morfolinilo, 4-propilmorfolinilo, furan-2-il metilo, furan-3-il metilo, pirdina-3-il metilo, (tetrahidro-2H-piran-4-il)metilo, (tetrahidro-2H-piran-4-il)etilo, tetrahidrofuran-2-il metilo, tetrahidrofuran-2-il etilo e indol-2-il propilo.

Un "halógeno" es flúor, cloro, bromo o yodo.

Un grupo "hidroxialquilo" es un grupo alquilo como se ha descrito anteriormente sustituido con uno o más grupos hidroxilo.

Un grupo "alcoxi" es -O-(alquilo), en el que alquilo se ha definido anteriormente.

Un grupo "alcoxialquilo" es -(alquil)-O-(alquilo), en el que alquilo se ha definido anteriormente.

Un grupo "amino" es un radical de la fórmula: -NH₂.

Un grupo "alquilamino" es un radical de la fórmula: -NH-alquilo o -N(alquilo)₂, en el que cada alquilo es independientemente como se ha definido anteriormente.

Un grupo "carboxi" es un radical de la fórmula: -C(O)OH.

Un grupo "aminocarbonilo" es un radical de la fórmula: -C(O)N(R[#])₂, -C(O)NH(R[#]) o -C(O)NH₂, en el que cada R[#] es independientemente un grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterocíclico o heterocíclico sustituido o no sustituido como se define en la presente memoria.

Un grupo "acilamino" es un radical de la fórmula: -NHC(O)(R[#]) o -N(alquil)C(O)(R[#]), en el que cada alquilo y R[#] son independientemente como se ha definido anteriormente.

Un grupo "alquilsulfonilamino" es un radical de la fórmula: -NHSO₂(R[#]) o -N(alquilo)SO₂(R[#]), en el que cada alquilo y R[#] se definen anteriormente.

Un grupo "urea" es un radical de la fórmula: -N(alquil)C(O)N(R[#])₂, -N(alquil)C(O)NH(R[#]), -N(alquil)C(O)NH₂, -NHC(O)N(R[#])₂, -NHC(O)NH(R[#]) o -NH(CO)NHR[#], en el que cada alquilo y R[#] son independientemente como se ha definido anteriormente.

Cuando los grupos descritos en la presente memoria, con la excepción del grupo alquilo, se dice que están "sustituidos" pueden estar sustituidos con cualquier sustituyente o sustituyentes apropiados. Los ejemplos ilustrativos de sustituyentes son aquellos encontrados en los compuestos y realizaciones ejemplares descritas en la presente memoria, así como halógeno (cloro, yodo, bromo o flúor); alquilo; hidroxilo; alcoxi; alcoxialquilo; amino; alquilamino; carboxi; nitro; ciano; tiol; tioéter; imina; imida; amidina; guanidina; enamina; aminocarbonilo; acilamino; fosfonato; fosfina; tiocarbonilo; sulfonilo; sulfona; sulfonamida; cetona; aldehído; éster; urea; uretano; oxima; hidroxil amina; alcoxiamina; aralcoxiamina; N-óxido; hidrazina; hidrazida; hidrazona; azida; isocianato; isotiocianato; cianato; tiocianato; oxígeno (=O); B(OH)₂, O(alquil)aminocarbonilo; cicloalquilo, que puede ser monocíclico o policíclico fusionado o no fusionado (p. ej., ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo), o un heterocíclico, que puede ser monocíclico o policíclico fusionado o no fusionado (p. ej., pirrolidilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo o tiazinilo);

arilo o heteroarilo monocíclico o policíclico fusionado o no fusionado (p. ej., fenilo, naftilo, pirrolilo, indolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, piridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, acridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidinilo, bencimidazolilo, benzotiofenilo o benzofuranilo) ariloxi; aralquilo; heterociciloxi; y heterocicilil alcoxi.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sal o sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a una sal preparada a partir de un ácido o base no tóxico farmacéuticamente aceptable incluyendo un ácido y base inorgánica y un ácido y base orgánica. Las sales de adición a base farmacéuticamente aceptables adecuadas de los inhibidores de la quinasa TOR incluyen, pero no están limitadas a, sales metálicas preparadas a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y cinc o sales orgánicas preparadas a partir de lisina, N,N'-
10 dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. Los ácidos no tóxicos adecuados incluyen, pero no están limitados a, ácidos inorgánicos y orgánicos tales como ácido acético, alginico, antranílico, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, furoico, galacturónico, glucónico, glucurónico, glutámico, glicólico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, sulfúrico, tartárico y ácido p-toluenosulfónico. Los ácidos no
15 tóxicos específicos incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, sulfúrico y metanosulfónico. Los ejemplos de sales específicas incluyen así las sales de hidrocloruro y mesilato. Otras son muy conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª eds., Mack Publishing, Easton PA (1990) o *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª eds., Mack Publishing, Easton PA (1995).

20 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, el término "clatrato" significa un inhibidor de la quinasa TOR, o una sal de este, en la forma de una red de cristal que contiene espacios (p. ej., canales) que tienen una molécula invitada (p. ej., un disolvente o agua) atrapada en ella o una red de cristal en la que un inhibidor de la quinasa TOR es una molécula invitada.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, el término "solvato" significa un inhibidor de la quinasa TOR, o una sal de este, que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de un disolvente unida por fuerzas intermoleculares no covalentes. En una realización, el solvato es un hidrato.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, el término "hidrato" significa un inhibidor de la quinasa TOR, o una sal de este, que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

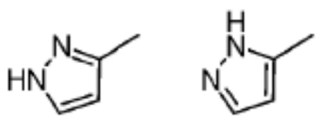
35 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, el término "profármaco" significa un derivado de un inhibidor de la quinasa TOR que puede hidrolizarse, oxidarse o reaccionar de otra forma en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar un compuesto activo, particularmente, un inhibidor de la quinasa TOR. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no están limitados a, derivados y metabolitos de un inhibidor de la quinasa TOR que incluyen restos biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres
40 biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables y análogos fosfato biohidrolizables. Como se describe en la presente memoria, los profármacos de compuestos con grupos funcionales carboxi son los ésteres de alquilo inferior del ácido carboxílico. Los ésteres carboxilato se forman convenientemente mediante la esterificación de cualquiera de los restos de ácido carboxílico presentes en la molécula. Los profármacos pueden prepararse típicamente usando métodos muy conocidos, tales como los descritos por *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* 6ª ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) y *Design and Application of Prodrugs* (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers Gmfn).

45 Tal y como se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique otra cosa, el término "estereoisómero" o "estereoméricamente puro" significa un estereoisómero de un inhibidor de la quinasa TOR que carece sustancialmente de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por ejemplo, un compuesto estereoméricamente puro que tiene un centro quiral carecerá sustancialmente del enantiómero opuesto del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro que tiene dos centros quirales carecerá sustancialmente de otros diastereómeros del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro típico comprende más de aproximadamente 80 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 20 % en peso de otros estereoisómeros del
50 compuesto, más de aproximadamente 90 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 10 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, más de aproximadamente 95 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 5 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o más de aproximadamente 97 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 3 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto. Los inhibidores de la quinasa TOR
55 pueden tener centros quirales y pueden aparecer como racematos, enantiómeros o diastereómeros individuales y mezclas de estos. Todas estas formas isoméricas están incluidas en las realizaciones descritas en la presente memoria, incluyendo mezclas de estas. El uso de formas estereoméricamente puras de dichos inhibidores de la quinasa TOR, así como el uso de mezclas de estas formas está englobado por las realizaciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, las mezclas que comprenden cantidades iguales o no iguales de los enantiómeros
60 de un inhibidor particular de la quinasa TOR pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Estos isómeros pueden sintetizarse asimétricamente o resolverse usando técnicas estándar tales

como columnas quirales o agentes de resolución quirales. Véase, p. ej., Jacques, J., *et al.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, Nueva York, 1981); Wilen, S. H., *et al.*, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. de Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

- 5 Debe indicarse también que los inhibidores de la quinasa TOR pueden incluir isómeros E y Z, o una mezcla de estos, e isómeros cis y trans o una mezcla de estos. En determinadas realizaciones, los inhibidores de la quinasa TOR se aíslan bien como el isómero cis o trans. En otras realizaciones, los inhibidores de la quinasa TOR son una mezcla de los isómeros cis y trans.

- 10 "Tautómeros" se refiere a formas isoméricas de un compuesto que están en equilibrio entre sí. Las concentraciones de las formas isoméricas dependerá del entorno en el que se encuentra el compuesto y pueden ser diferentes dependiendo, por ejemplo, de si el compuesto es un sólido o está en una disolución acuosa u orgánica. Por ejemplo, en disolución acuosa, los pirazoles pueden presentar las siguientes formas isoméricas que se refieren como tautómeros una de otra:



- 15 Como entiende fácilmente un experto en la técnica, una amplia variedad de grupos funcionales y otras estructuras pueden presentar tautomerismo y todos los tautómeros de los inhibidores de la quinasa TOR están en el alcance de la presente invención.

- 20 Debe indicarse también que los inhibidores de la quinasa TOR pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radiactivos, tal como, por ejemplo, tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I), azufre-35 (^{35}S) o carbono-14 (^{14}C) o pueden estar enriquecidos isotópicamente, tal como con deuterio (^2H), carbono-13 (^{13}C) o nitrógeno-15 (^{15}N). Tal y como se usa en la presente memoria, un "isotópologo" es un compuesto enriquecido isotópicamente. El término "enriquecido isotópicamente" se refiere a un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo. "Enriquecido isotópicamente" también puede referirse a un compuesto que contiene al menos un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo. El término "composición isotópica" se refiere a la cantidad de cada isótopo presente para un átomo dado. Los compuestos radiomarcados y enriquecidos isotópicamente son útiles como agentes terapéuticos, p. ej., agentes terapéuticos para el cáncer y la inflamación, reactivos de investigación, p. ej., parejas de un ensayo de unión y agentes de diagnóstico, p. ej., agentes de formación de imágenes in vivo.

- 30 "Tratar", tal y como se usa en la presente memoria, significa un alivio, en todo o en parte, de los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad (p. ej., cáncer o un síndrome tumoral) o ralentización o parada de la progresión o empeoramiento adicional de estos síntomas.

"Prevenir", tal y como se usa en la presente memoria, significa la prevención del inicio, recurrencia o diseminación, en todo o en parte, de la enfermedad o trastorno (p. ej., cáncer) o un síntoma de este.

- 35 El término "cantidad efectiva", en conexión con un inhibidor de la quinasa TOR, significa una cantidad capaz de aliviar, en todo o en parte, los síntomas asociados con el cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino o un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, o ralentizar o parar la progresión o empeoramiento adicional de estos síntomas, o prevenir o proporcionar profilaxis para el cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino o un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers en un sujeto que presenta riesgo de cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino o un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers. La cantidad efectiva del inhibidor de la quinasa TOR, por ejemplo, en una composición farmacéutica, puede estar a un nivel que ejercerá el efecto deseado; por ejemplo, aproximadamente 0,005 mg/kg del peso corporal de un sujeto a aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal de un paciente en dosificación unitaria tanto para administración oral como parenteral. Como será evidente para los expertos en la técnica, se esperará que la cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR descrito en la presente memoria puede variar dependiendo de la gravedad de la indicación que se está tratando.

- 50 Los términos "paciente" y "sujeto", tal y como se usan en la presente memoria, incluyen un animal, incluyendo, pero no limitado a, un animal tal como una vaca, mono, caballo, oveja, cerdo, pollo, pavo, perdiz, gato, perro, ratón, rata, conejo o cobaya, en una realización un mamífero, en otra realización un ser humano.

Tal y como se usa en la presente memoria "de tipo salvaje" se refiere a la forma típica o más común de una característica (por ejemplo, secuencia o presencia génica o secuencia, presencia, nivel o actividad proteica), tal y como ocurre en la naturaleza y la referencia frente a la que se comparan todos los demás. Como entenderá un

experto en la técnica, cuando se usa en la presente memoria, de tipo salvaje se refiere a la secuencia típica del gen o proteína LKB1 o del gen o proteína AMPK o al nivel típico del gen o proteína LKB1, gen o proteína AMPK, proteína pAMPK o actividad de AMPK, tal y como ocurre lo más comúnmente en la naturaleza. De forma similar, un "paciente control", tal y como se usa en la presente memoria, es un paciente que posee las características de tipo salvaje (presencia, secuencia, nivel, actividad) para LKB1 y/o AMPK. Por ejemplo, tal y como se usa en la presente memoria "mutación en el gen o proteína LKB1" se refiere, por ejemplo, a una mutación en el gen LKB1 que da como resultado una disminución en la expresión del ARNm de LKB1, una disminución en la producción de la proteína LKB1 o una proteína LKB1 no funcional, comparado con el tipo salvaje. Tal y como se usa en la presente memoria, "pérdida del gen o proteína LKB1" se refiere a un nivel reducido de la proteína LKB1 o la ausencia de la proteína LKB1, comparado con los niveles de tipo salvaje.

Tal y como se usa en la presente memoria, "actividad de AMPK" se refiere a la actividad de la proteína quinasa activada por AMP. Como entiende un experto en la técnica, AMPK requiere la activación por fosforilación para ejercer su actividad quinasa. En el contexto de la actividad de AMPK, se entiende que la actividad de AMPK y la actividad de pAMPK pueden usarse indistintamente.

Tal y como se usa en la presente memoria, "nivel reducido" o "pérdida" significa una reducción en el nivel respecto a los niveles observados en el tipo salvaje. En una realización, la reducción es el 10 % - 50 % o 50 %-100 %. En algunas realizaciones, la reducción es el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % (pérdida completa) respecto al tipo salvaje.

En una realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano cuyo ADN del cáncer comprende una mutación en el gen LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano cuyo ADN del cáncer contiene una mutación en el gen LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano cuyo ADN del cáncer comprende una mutación en el gen LKB1 y una mutación en el gen KRAS, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, caracterizado por la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, caracterizado por la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y una mutación en el gen KRAS, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje.

En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano cuyo ADN comprende una mutación en el gen LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano cuyo ADN contiene una mutación en el gen LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano cuyo ADN comprende una mutación en el gen LKB1 y una mutación en el gen KRAS, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano que tiene pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano que tiene pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, y también que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers. En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano que tiene pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y una mutación en el gen KRAS, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que dicho ser humano también tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers.

En otra realización, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, caracterizado por un nivel reducido de actividad de la proteína pAMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. Como también se describe en la presente memoria, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano que tiene un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, caracterizado por un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de actividad de AMPK y una mutación en el gen KRAS, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la pAMPK es pAMPK T172.

Como también se describe en la presente memoria, un "paciente" o "sujeto" es un ser humano que tiene un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de actividad de AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje y también que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers. Como también se describe en la presente memoria, un "paciente" o "sujeto" es un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de actividad de AMPK y una mutación en el gen KRAS, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que dicho ser humano también tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers. La pAMPK puede ser pAMPK T172.

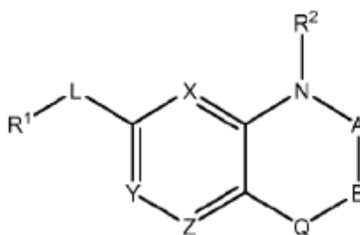
En el contexto del cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino o un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, la inhibición puede evaluarse por la aparición retardada de tumores primarios o secundarios, desarrollo ralentizado de tumores primarios o secundarios, aparición disminuida de tumores primarios o secundarios, gravedad ralentizada o disminuida de los efectos secundarios de la enfermedad, parada del crecimiento tumoral y regresión de los tumores, entre otros. En el extremo, inhibición completa, se refiere en la presente memoria como prevención o quimioprevención. En este contexto, el término

"prevención" incluye bien prevenir el inicio de cáncer, carcinoma o tumor clínicamente evidente conjuntamente o prevenir el inicio de un estadio preclínicamente evidente del cáncer, carcinoma o tumor en individuos que presentan riesgo. También se pretende englobar en esta definición la prevención de la transformación en células malignas o la parada o reversión de la progresión de las células premalignas a células malignas. Esto incluye el tratamiento profiláctico de aquellos que presentan riesgo de desarrollar el cáncer, carcinoma o tumor.

6.2 Inhibidores de la quinasa TOR

Los compuestos proporcionados en la presente memoria se refieren generalmente como inhibidores de la quinasa TOR o "TORKi". En una realización específica, los TORKi no incluyen rapamicina o análogos de rapamicina (rapálogos). En determinadas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente memoria también son inhibidores de ADN-PK o "ADN-PKi".

Como se describe en la presente memoria, los inhibidores de la quinasa TOR incluyen compuestos que tienen la siguiente fórmula (I):



(I)

y sales, clatratos, solvatos, estereoisómeros, tautómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables de estos en la que:

X, Y y Z son en cada aparición independientemente N o CR³, en el que al menos uno de X, Y y Z es N y al menos uno de X, Y y Z es CR³;

-A-B-Q- tomados conjuntamente forman -CHR⁴C(O)NH-, -C(O)CHR⁴NH-, -C(O)NH-, -CH₂C(O)O-, -C(O)CH₂O-, -C(O)O- o C(O)NR³;

L es un enlace directo, NH u O;

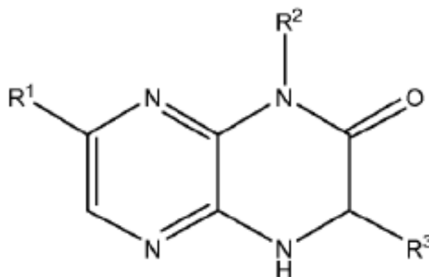
R¹ es H, alquiloC₁₋₈ sustituido o no sustituido, alquenoC₂₋₈ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido o heterociclilalquilo sustituido o no sustituido;

R² es H, alquiloC₁₋₈ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido o heterociclilalquilo sustituido o no sustituido;

R³ es H, alquiloC₁₋₈ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterociclilalquilo sustituido o no sustituido, -NHR⁴ o -N(R⁴)₂; y

R⁴ es en cada aparición independientemente alquiloC₁₋₈ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido o heterociclilalquilo sustituido o no sustituido.

En una realización, los inhibidores de la quinasa TOR incluyen compuestos que tienen la siguiente fórmula (IV):



(IV)

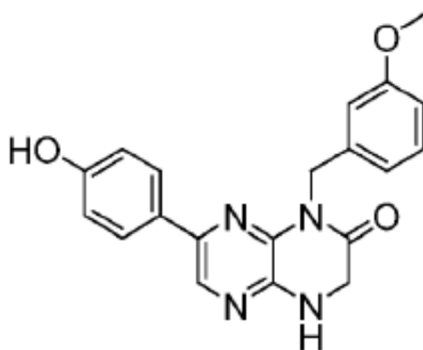
y sales, clatratos, solvatos, estereoisómeros, tautómeros y profármacos farmacéuticamente aceptables de estos en la que:

R¹ es alquilo C₁₋₈ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido o heterociclilalquilo sustituido o no sustituido;

5 R² es H, alquilo C₁₋₈ sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, heterociclilalquilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido o cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido;

R³ es H o un alquilo C₁₋₈ sustituido o no sustituido,

10 en el que, en determinadas realizaciones, los inhibidores de la quinasa TOR no incluyen 7-(4-hidroxifenil)-1-(3-metoxibencil)-3,4-dihidropirazino[2,3-b]pirazin-2(1H)-ona, representado a continuación:



En una realización preferida, el inhibidor de la quinasa TOR de fórmula (IV) es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-b]pirazin-2(1H)-ona;

y sales, clatratos, solvatos, estereoisómeros o tautómeros farmacéuticamente aceptables de este.

15 6.3 Métodos para preparar los inhibidores de la quinasa TOR

Los inhibidores de la quinasa TOR pueden obtenerse a través de metodología sintética estándar muy conocida, véase p. ej., March, J. Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms, and Structure, 4^a ed., 1992. Los materiales de partida útiles para preparar los compuestos de fórmula (III) e intermedios de estos, están disponibles comercialmente o pueden prepararse a partir de materiales disponibles comercialmente usando métodos y reactivos sintéticos conocidos.

Los métodos particulares para preparar los compuestos de fórmula (III) y (IV) se describen en la Solicitud U.S. No. 12/605.791, presentada el 26 de octubre, 2009.

6.4 Métodos de uso

25 Sin estar limitado por teoría, se cree que LKB1 juega un papel importante en el brazo de detección de nutrientes de la ruta mTOR. En particular, se cree que LKB1 es un regulador negativo de la ruta mTOR bajo condiciones de estrés, tales como hipoxia y glucosa baja. LKB1 suprime la actividad de mTOR a través de su quinasa aguas abajo, proteína quinasa activada por AMP (AMPK). En respuesta a estrés energético, LKB1 fosforila la subunidad catalítica de AMPK en T172 y esta fosforilación es esencial para la activación de AMPK. La AMPK activada fosforila TSC2 y raptor y suprime la actividad de mTOR [Shackelford DB y Shaw JS, *Nat. Rev. Cancer* 9:563 (2009)]. Por lo tanto, la fosforilación o actividad de AMPK puede usarse como un marcador para el estado de LKB1. En condiciones basales, se cree que la pérdida de LKB1 y/o AMPK puede dar como resultado una activación de la ruta mTOR. En las células cancerosas, bajo condiciones de estrés, se cree que la ruta LKB1/AMPK puede jugar realmente un papel protector causando que las células ralenticen su proliferación y evadan así la apoptosis inducida por la condición de estrés. Sin embargo, se cree que en las células cancerosas mutantes para LKB1 (p. ej., células que portan una mutación en el gen LKB1 que da como resultado una disminución en la expresión del ARNm de LKB1, una disminución en la producción de la proteína LKB1 o una proteína LKB1 no funcional), en ausencia de la señal negativa para mTOR, las células cancerosas continúan proliferando y experimentan una catástrofe metabólica. De acuerdo con esto, sin estar limitado por teoría, se cree que los Inhibidores de la quinasa TOR por sus efectos en el metabolismo celular causan una respuesta de estrés en las células cancerosas y en las células cancerosas mutantes para LKB1, y en ausencia de una señal negativa para ralentizar el crecimiento de las células, da como resultado la muerte celular.

En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR a

un paciente que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, caracterizado por la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje.

5 En la presente memoria se describen métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que tiene un cáncer o un síndrome tumoral caracterizado por un nivel reducido de proteína fosfo-AMPK (pAMPK) o actividad de AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje. En una realización, la pAMPK es pAMPK T172.

10 En la presente memoria se proporcionan además métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden cribar el cáncer de un paciente para detectar la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, y administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR al paciente que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, caracterizado por la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1.

15 En la presente memoria se describen además métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden cribar el cáncer de un paciente para detectar la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK o de la actividad de AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, y administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR al paciente que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, caracterizado por un nivel reducido de la proteína pAMPK o de actividad de AMPK. En una realización, la pAMPK es pAMPK T172.

20 En la presente memoria se proporcionan además métodos para detectar pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer de un paciente ("paciente de ensayo"), por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de expresión del ARNm de LKB1, el nivel de la expresión de la proteína LKB1, determinar el estado de metilación del gen LKB1 o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 (p. ej., por secuenciación de ADNc, ADNc directa o ADN exónico o análisis de SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida del número de copias o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 (de tipo salvaje); en el que un cambio en la expresión del ARNm de LKB1, expresión de la proteína LKB1, estructura del ARNm de LKB1, estado de metilación del gen LKB1 y/o estructura de la proteína LKB1 en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer del paciente de ensayo.

35 En la presente memoria también se describen métodos para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK en el cáncer de un paciente ("paciente de ensayo"), por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión del ARNm de AMPK, el nivel de la expresión de la proteína AMPK, determinar el estado de metilación del gen AMPK o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK (p. ej., por secuenciación de ADNc, ADNc directa o ADN exónico o análisis de SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida del número de copias o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por una pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK (de tipo salvaje); en el que un cambio en la expresión del ARNm de AMPK, expresión de la proteína AMPK, estructura del ARNm de AMPK, estado de metilación del gen AMPK y/o estructura de la proteína AMPK en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer del paciente de ensayo.

40 En la presente memoria también se describen métodos para detectar un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer de un paciente ("paciente de ensayo"), por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, que comprenden: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de expresión de la proteína pAMPK, el nivel de la actividad de AMPK, o medir de otra manera el nivel de la proteína pAMPK (p. ej., inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar la cantidad de proteína pAMPK o la cantidad de fosforilación de AMPK en sitios específicos, por ejemplo, en el sitio T172), y/o el nivel de la actividad de AMPK (p. ej., ensayo de la quinasa AMPK, véase Sanders *et al. Biochem.J.* 403:139-148 (2007)); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK (de tipo salvaje); en el que un nivel menor de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, indica la

presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer del paciente de ensayo.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para predecir la probabilidad de que un paciente ("paciente de ensayo") que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, responda a terapia con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de expresión del ARNm de LKB1, el nivel de la expresión de la proteína LKB1, determinar el estado de metilación del gen LKB1 o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 (p. ej., por secuenciación de ADNc directo o ADN exónico o análisis de SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida del número de copias o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1; en el que un cambio en la expresión del ARNm de LKB1, expresión de la proteína LKB1, estructura del ARNm de LKB1, estado de metilación del gen LKB1 y/o estructura de la proteína LKB1 en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, predice una probabilidad incrementada de que la terapia con un inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino.

En la presente memoria también se describen métodos para predecir la probabilidad de que un paciente ("paciente de ensayo") que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, responda a terapia con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión del ARNm de AMPK, el nivel de la expresión de la proteína AMPK, determinar el estado de metilación del gen AMPK o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK (p. ej., por secuenciación de ADNc directo o ADN exónico o análisis de SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida del número de copias o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK; en el que un cambio en la expresión del ARNm de AMPK, expresión de la proteína AMPK, estructura del ARNm de AMPK, estado de metilación del gen AMPK y/o estructura de la proteína AMPK en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, predice una probabilidad incrementada de que la terapia con un inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino.

En la presente memoria también se describen métodos para predecir la probabilidad de que un paciente ("paciente de ensayo") que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, responda a terapia con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden: obtener una muestra biológica del cáncer del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de expresión de la proteína pAMPK, el nivel de la actividad de AMPK o medir de otra manera el nivel de la proteína pAMPK (p. ej., inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar la cantidad de la proteína pAMPK o la cantidad de fosforilación de AMPK en sitios específicos, por ejemplo, en el sitio T172) y/o el nivel de la actividad de AMPK (p. ej., ensayo de la quinasa AMPK, véase Sanders *et al. Biochem.J.* 403:139-148 (2007)); y comparar dicha medición con una medición control del cáncer de un paciente ("paciente control") que no se caracteriza por un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK (de tipo salvaje); en el que un nivel menor de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, predice una probabilidad incrementada de que la terapia con un inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden: cribar el cáncer de dicho paciente para detectar la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de dicha pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer del paciente es predictiva de la eficacia terapéutica del tratamiento con un inhibidor de la quinasa TOR.

En la presente memoria también se describen métodos para predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden: cribar el cáncer de dicho paciente para detectar la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de dicho nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer del paciente es predictiva de la eficacia terapéutica del tratamiento con un inhibidor de la quinasa TOR. En una realización, la pAMPK es pAMPK T172.

En la presente memoria también se describen métodos para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden cribar el paciente para detectar la presencia de una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y/o AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, y administrar una cantidad

efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR al paciente que tiene la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y/o AMPK.

En la presente memoria también se describen métodos para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden cribar el paciente para detectar la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, y administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR al paciente que tiene el nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK. En una realización, la pAMPK es pAMPK T172.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en un paciente ("paciente de ensayo") que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden: obtener una muestra biológica del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión del ARNm de LKB1, el nivel de la expresión de la proteína LKB1, determinar el estado de metilación del gen LKB1 o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína (p. ej., por secuenciación de ADNc directo o ADN exónico o análisis de SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida del número de copias o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control de un paciente ("paciente control") sin la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 (de tipo salvaje); en el que un cambio en la expresión del ARNm de LKB1, expresión de la proteína LKB1, estructura del ARNm de LKB1, estado de metilación del gen LKB1 y/o estructura de la proteína LKB1 en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en dicho paciente de ensayo. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no están limitados a, muestras de tejido, sangre, saliva, pelo, muestras de tejido enfermo, frotis bucales o muestras tumorales.

En la presente memoria también se describen métodos para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK en un paciente ("paciente de ensayo") que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden: obtener una muestra biológica del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión del ARNm de AMPK, el nivel de expresión de la proteína AMPK, determinar el estado de metilación del gen AMPK o identificar de otra manera la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína (p. ej., por secuenciación de ADNc directo o ADN exónico o análisis de SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) para identificar la pérdida del número de copias o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar pérdida de proteína); y comparar dicha medición con una medición control de un paciente ("paciente control") sin la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK (de tipo salvaje); en el que un cambio en la expresión del ARNm de AMPK, expresión de la proteína AMPK, estructura del ARNm de AMPK, estado de metilación del gen AMPK y/o estructura de la proteína AMPK en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK en el paciente de ensayo. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no están limitados a, muestras de tejido, sangre, saliva, pelo, muestras de tejido enfermo, frotis bucales o muestras tumorales.

En la presente memoria también se describen métodos para detectar un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en un paciente ("paciente de ensayo") que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden: obtener una muestra biológica del paciente de ensayo; medir uno o más del nivel de la expresión de la proteína pAMPK, el nivel de la actividad de AMPK, o medir de otra manera el nivel de la proteína pAMPK (p. ej., inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western para determinar la cantidad de la proteína pAMPK o la cantidad de fosforilación de AMPK en sitios específicos, por ejemplo, en el sitio T172), y/o el nivel de la actividad de AMPK (p. ej., ensayo de quinasa AMPK, véase Sanders *et al. Biochem.J.* 403:139-148 (2007)); y comparar dicha medición con una medición control de un paciente ("paciente control") sin un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK (de tipo salvaje); en el que un nivel menor de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en la muestra biológica del paciente de ensayo, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, indica la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el paciente de ensayo. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no están limitados a, muestras de tejido, sangre, saliva, pelo, muestras de tejido enfermo, frotis bucales o muestras tumorales.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, responda a terapia con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden cribar a dicho paciente para detectar la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y/o AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y/o AMPK predice una probabilidad incrementada de que la terapia con un inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho síndrome tumoral.

En la presente memoria también se describen métodos para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, responda a terapia con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden cribar a dicho paciente para detectar la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK predice una probabilidad incrementada de que la

terapia con un inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho síndrome tumoral. En una realización, la pAMPK es pAMPK T172.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden cribar a dicho paciente para detectar la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el paciente es predictiva de la eficacia terapéutica del tratamiento con un inhibidor de la quinasa TOR.

En la presente memoria también se describen métodos para predecir la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente que tiene un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprenden cribar a dicho paciente para detectar la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje, en el que la presencia de un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el paciente es predictiva de la eficacia terapéutica del tratamiento con un inhibidor de la quinasa TOR.

En la presente memoria también se describen métodos para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o para tratar un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, que comprenden administrar una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR y una cantidad efectiva de uno o más agentes que modulan los niveles de AMP, captación de glucosa, metabolismo o una respuesta de estrés a un paciente que tiene cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o un síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers.

En la presente memoria se proporcionan además kits que comprenden uno o más contenedores llenos con un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de este, reactivos para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, o la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK, o ambos, en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral, e instrucciones para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, o la pérdida de o mutación en el gen o proteína AMPK, o ambos, en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral. En una realización, el kit comprende además instrucciones para administrar un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de este a un paciente que lo necesita.

En la presente memoria también se describen kits que comprenden uno o más contenedores llenos con un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de este, reactivos para detectar un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral, e instrucciones para detectar un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral. En una realización, el kit comprende además instrucciones para administrar un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de este a un paciente que lo necesita.

En una realización, la mutación en o la pérdida del gen LKB1 da como resultado una disminución en la expresión del ARNm de LKB1 (p. ej., respecto al tipo salvaje). En otra realización, la mutación en o la pérdida del gen LKB1 da como resultado un cambio en la estructura del ARNm de LKB1 (p. ej., respecto al tipo salvaje). En otra realización, la mutación en o la pérdida del gen LKB1 da como resultado una disminución en la producción de la proteína LKB1 (p. ej., respecto al tipo salvaje). En otra realización, la mutación en o la pérdida del gen LKB1 da como resultado un cambio en la estructura de la proteína LKB1 (p. ej., respecto al tipo salvaje). Los tipos de mutaciones génicas contemplados incluyen mutaciones en la secuencia del ADN de LKB1 en las que el número de bases se altera, clasificadas como mutaciones de inserción o delección (mutaciones de cambio de marco de lectura) y mutaciones en el ADN que cambian una base por otra, clasificadas como mutaciones de cambio de sentido, que se subdividen en las clases de transiciones (una purina a otra purina, o una pirimidina a otra pirimidina) y transversiones (una purina a una pirimidina, o una pirimidina a una purina) y mutaciones sin sentido, en las que un codón que codifica un aminoácido se cambia a un codón de parada, dando así como resultado una proteína truncada.

En una realización, la mutación en o la pérdida del gen LKB1 da como resultado una disminución en la fosforilación de AMPK (p. ej., respecto al tipo salvaje). En otra realización, la mutación en o la pérdida del gen LKB1 da como resultado una disminución en la fosforilación de AMPK en T172. (p. ej., respecto al tipo salvaje). En otra realización, la mutación en o la pérdida del gen LKB1 da como resultado una disminución en el nivel de la proteína pAMPK (p. ej., respecto al tipo salvaje). En otra realización, la mutación en o la pérdida del gen LKB1 da como resultado una disminución en la actividad de AMPK (es decir, actividad quinasa) (p. ej., respecto al tipo salvaje).

En la presente memoria también se describe que la mutación en o la pérdida del gen AMPK da como resultado una disminución en la expresión del ARNm de AMPK (p. ej., respecto al tipo salvaje). En otra realización, la mutación en o la pérdida del gen AMPK da como resultado un cambio en la estructura del ARNm de AMPK (p. ej., respecto al tipo salvaje). En otra realización, la mutación en o la pérdida del gen AMPK da como resultado una disminución en la producción de la proteína AMPK (p. ej., respecto al tipo salvaje). En la presente memoria se describe además que la mutación en o la pérdida del gen AMPK da como resultado un cambio en la estructura de la proteína AMPK (p. ej.,

respecto al tipo salvaje). Los tipos de mutaciones génicas contemplados incluyen mutaciones en la secuencia de ADN de AMPK en las que el número de bases se altera, clasificadas como mutaciones de inserción o delección (mutaciones de cambio del marco de lectura), y mutaciones en el ADN que cambian una base por otra, clasificadas como mutaciones con cambio de sentido, que se subdividen en las clases de transiciones (una purina a otra purina, o una pirimidina a otra pirimidina) y transversiones (una purina a una pirimidina, o una pirimidina a una purina) y mutaciones sin sentido, en las que un codón que codifica un aminoácido se cambia a un codón de parada, dando así como resultado una proteína truncada.

En determinadas realizaciones, el cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas o cáncer del cuello uterino, o el síndrome tumoral, por ejemplo, Síndrome de Peutz-Jeghers, resulta directamente o indirectamente de la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y/o AMPK, respecto al de un paciente control o de tipo salvaje.

En una realización, la mutación en el gen LKB1 y/o AMPK es una mutación somática.

En una realización, un paciente o el cáncer de un paciente se criba para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 y/o AMPK mediante la obtención de una muestra biológica de dicho paciente o del cáncer de dicho paciente, y el análisis de dicha muestra *ex vivo*. En determinadas realizaciones, el análisis *ex vivo* se realiza por secuenciación de ADNc directa o ADN exónico del gen LKB1, análisis SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) (p. ej., para identificar la pérdida del número de copias) o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western (p. ej., para determinar la pérdida de proteína). En determinadas realizaciones, el análisis *ex vivo* se realiza por secuenciación de ADNc directa o ADN exónico del gen AMPK, análisis SNP o amplificación dependiente de ligación de múltiples sondas (MLPA) (p. ej., para identificar la pérdida del número de copias) o inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western (p. ej., para determinar la pérdida de proteína). En otra realización, un paciente o el cáncer de un paciente se criba para detectar un nivel reducido de la proteína pAMPK y/o de la actividad de AMPK mediante la obtención de una muestra biológica de dicho paciente o del cáncer de dicho paciente, y el análisis de dicha muestra *ex vivo*. En determinadas realizaciones, el análisis *ex vivo* se realiza por inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), o Transferencia Western (p. ej., para determinar la cantidad de la proteína pAMPK o la cantidad de fosforilación de AMPK en sitios específicos, por ejemplo, en el sitio T172), o por un ensayo de quinasa AMPK (p. ej., para determinar el nivel de la actividad de AMPK).

Un inhibidor de la quinasa TOR puede combinarse con otros compuestos farmacológicamente activos ("segundos agentes activos") en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Se cree que determinadas combinaciones pueden funcionar en el tratamiento de tipos particulares de enfermedades o trastornos y afecciones y síntomas asociados con dichas enfermedades o trastornos. Un inhibidor de la quinasa TOR también puede funcionar para aliviar los efectos adversos asociados con determinados segundos agentes activos y viceversa.

Uno o más segundos ingredientes o agentes activos pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Los segundos agentes activos pueden ser moléculas grandes (p. ej., proteínas) o moléculas pequeñas (p. ej., moléculas sintéticas inorgánicas, organometálicas u orgánicas).

Los ejemplos de segundos agentes activos incluyen, pero no están limitados a, agentes que modulan los niveles de AMP (p. ej., un activador de AMP), captación de glucosa, metabolismo o una respuesta de estrés. En una realización, el segundo agente activo es 2-desoxiglucosa. En una realización, el segundo agente activo es metformina. En una realización, el segundo agente activo es fenformina. En otra realización, el segundo agente activo es pemetrexed (p. ej., ALIMTA®).

La administración de un inhibidor de la quinasa TOR y uno o más segundos agentes activos a un paciente se puede producir simultáneamente o secuencialmente por la misma o diferentes rutas de administración. La idoneidad de una ruta de administración particular empleada para un agente activo particular dependerá del agente activo en sí mismo (p. ej., si puede administrarse oralmente sin descomponerse antes de entrar en la corriente sanguínea) y de la enfermedad que se está tratando. Una ruta de administración preferida para un inhibidor de la quinasa TOR es la oral. Las rutas de administración preferidas de los segundos agentes o ingredientes activos de la invención son conocidas para los expertos en la técnica. Véase, p. ej., *Physicians' Desk Reference*, 1755-1760 (56ª ed., 2002).

En una realización, un segundo agente activo se administra intravenosamente o subcutáneamente y una o dos veces al día en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 350 mg o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg. La cantidad específica del segundo agente activo dependerá del agente específico usado, del tipo de enfermedad que se está tratando o gestionando, de la gravedad y estadio de la enfermedad y de la o las cantidades de un inhibidor de la quinasa TOR y cualesquiera agentes activos adicionales opcionales administrados concurrentemente al paciente.

En la presente memoria también se describen métodos para reducir, tratar y/o prevenir efectos adversos o no deseados asociados con la terapia convencional incluyendo, pero no limitado a, cirugía, quimioterapia, terapia con radiación, terapia hormonal, terapia biológica e inmunoterapia. Los inhibidores de la quinasa TOR y otros

ingredientes activos pueden administrarse a un paciente antes de, durante o después de la aparición del efecto adverso asociado con la terapia convencional.

6.5 Composiciones farmacéuticas y rutas de administración

5 En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR y composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR y un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en la presente memoria es adecuada para administración oral, parenteral, mucosal, transdérmica o tópica.

10 Los inhibidores de la quinasa TOR pueden administrarse a un paciente oralmente o parenteralmente en la forma convencional de preparaciones, tales como cápsulas, microcápsulas, comprimidos, gránulos, polvo, tabletas, píldoras, supositorios, inyecciones, suspensiones y jarabes. Las formulaciones adecuadas pueden prepararse por los métodos empleados comúnmente usando aditivos orgánicos o inorgánicos convencionales, tales como un excipiente (p. ej., sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato de calcio o carbonato de calcio), un aglutinante (p. ej., celulosa, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, polipropilpirrolidona, polivinilpirrolidona, gelatina, goma arábiga, polietilenglicol, sacarosa o almidón), un disgregante (p. ej., almidón, carboximetilcelulosa, hidroxipropilalmidón, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, bicarbonato de sodio, fosfato de calcio o citrato de calcio), un lubricante (p. ej., estearato de magnesio, ácido silícico anhidro ligero, talco o lauril sulfato de sodio), un agente saporífero (p. ej., ácido cítrico, mentol, glicina o polvo de naranja), un conservante (p. ej., benzoato de sodio, bisulfito de sodio, metilparabeno o propilparabeno), un estabilizante (p. ej., ácido cítrico, citrato de sodio o ácido acético), un agente de suspensión (p. ej., metilcelulosa, polivinil pirrolidona o estearato de aluminio), un agente dispersante (p. ej., hidroxipropilmetilcelulosa), un diluyente (p. ej., agua) y cera base (p. ej., manteca de cacao, petrolato blanco o polietilén glicol). La cantidad efectiva del inhibidor de la quinasa TOR en la composición farmacéutica puede estar en un nivel que ejercerá el efecto deseado; por ejemplo, aproximadamente 0,005 mg/kg del peso corporal de un paciente a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal de un paciente en dosificación unitaria tanto para administración oral como parenteral.

25 La dosis de un inhibidor de la quinasa TOR que se va a administrar a un paciente es bastante ampliamente variable y puede someterse al criterio de un médico responsable. En general, los inhibidores de la quinasa TOR pueden administrarse una a cuatro veces al día en una dosis de aproximadamente 0,005 mg/kg del peso corporal de un paciente a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal de un paciente en un paciente, pero la dosificación anterior puede variarse apropiadamente dependiendo de la edad, peso corporal y afección médica del paciente y el tipo de administración. En una realización, la dosis es aproximadamente 0,01 mg/kg del peso corporal de un paciente a aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal de un paciente, aproximadamente 0,05 mg/kg del peso corporal de un paciente a aproximadamente 1 mg/kg del peso corporal de un paciente, aproximadamente 0,1 mg/kg del peso corporal de un paciente a aproximadamente 0,75 mg/kg del peso corporal de un paciente o aproximadamente 0,25 mg/kg del peso corporal de un paciente a aproximadamente 0.5 mg/kg del peso corporal de un paciente. En una realización, se proporciona una dosis al día. En cualquier caso dado, la cantidad del inhibidor de la quinasa TOR administrada dependerá de factores tales como la solubilidad del componente activo, la formulación usada y la ruta de administración.

40 En otra realización, en la presente memoria se proporcionan métodos para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno que comprenden la administración de aproximadamente 0,375 mg/día a aproximadamente 750 mg/día, aproximadamente 0,75 mg/día a aproximadamente 375 mg/día, aproximadamente 3,75 mg/día a aproximadamente 75 mg/día, aproximadamente 7,5 mg/día a aproximadamente 55 mg/día o aproximadamente 18 mg/día a aproximadamente 37 mg/día de un inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que lo necesita.

45 En otra realización, en la presente memoria se proporcionan métodos para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno que comprenden la administración de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 1.200 mg/día, aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 1.200 mg/día, aproximadamente 100 mg/día a aproximadamente 1.200 mg/día, aproximadamente 400 mg/día a aproximadamente 1.200 mg/día, aproximadamente 600 mg/día a aproximadamente 1.200 mg/día, aproximadamente 400 mg/día a aproximadamente 800 mg/día o aproximadamente 600 mg/día a aproximadamente 800 mg/día de un inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que lo necesita. En una realización particular, los métodos descritos en la presente memoria comprenden la administración de 400 mg/día, 600 mg/día o 800 mg/día de un inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que lo necesita.

55 En otra realización, en la presente memoria se proporcionan formulaciones de dosificación unitaria que comprenden entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 2.000 mg, aproximadamente 1 mg y 200 mg, aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1.400 mg, aproximadamente 125 mg y aproximadamente 1.000 mg, aproximadamente 250 mg y aproximadamente 1.000 mg o aproximadamente 500 mg y aproximadamente 1.000 mg de un inhibidor de la quinasa TOR.

En una realización particular, en la presente memoria se proporcionan formulaciones de dosificación unitaria que comprenden aproximadamente 100 mg o 400 mg de un inhibidor de la quinasa TOR.

En otra realización, en la presente memoria se proporcionan formulaciones de dosificación unitaria que comprenden 1 mg, 2,5 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 35 mg, 50 mg, 70 mg, 100 mg, 125 mg, 140 mg, 175 mg, 200 mg, 250 mg, 280 mg, 350 mg, 500 mg, 560 mg, 700 mg, 750 mg, 1.000 mg o 1.400 mg de un inhibidor de la quinasa TOR.

5 Un inhibidor de la quinasa TOR puede administrarse una, dos, tres, cuatro o más veces diariamente.

Un inhibidor de la quinasa TOR puede administrarse oralmente por razones de conveniencia. En una realización, cuando se administra oralmente, un inhibidor de la quinasa TOR se administra con una comida y agua. En otra realización, el inhibidor de la quinasa TOR se dispersa en agua o zumo (p. ej., zumo de manzana o zumo de naranja) y se administra oralmente como una suspensión. En otra realización, cuando se administra oralmente, un

10 inhibidor de la quinasa TOR se administra en un estado de ayunas.

El inhibidor de la quinasa TOR también puede administrarse intradérmicamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, percutáneamente, intravenosamente, subcutáneamente, intranasalmente, epiduralmente, sublingualmente, intracerebralmente, intravaginalmente, transdérmicamente, rectalmente, mucosalmente, por inhalación o tópicamente en los oídos, nariz, ojos o piel. El modo de administración se deja a la discreción del

15 médico responsable y puede depender, en parte, del sitio de la afección médica.

En una realización, en la presente memoria se proporcionan cápsulas que contienen un inhibidor de la quinasa TOR sin un transportador, excipiente o vehículo adicional.

En otra realización, en la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR y un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable, en las que un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender un excipiente, diluyente o una mezcla de

20 estos. En una realización adicional, en la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un inhibidor de la quinasa TOR, y un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más agentes que modulan los niveles de AMP, captación de glucosa, metabolismo o una respuesta de estrés. En una realización, la composición es una composición farmacéutica.

Las composiciones pueden estar en la forma de comprimidos, comprimidos masticables, cápsulas, disoluciones, disoluciones parenterales, tabletas, supositorios y suspensiones y semejantes. Las composiciones pueden formularse para contener una dosis diaria, o una fracción conveniente de una dosis diaria, en una dosificación unitaria, que puede ser un único comprimido o cápsula o un volumen conveniente de un líquido. En una realización, las disoluciones se preparan a partir de sales solubles en agua, tales como la sal hidrócloruro. En general, todas las composiciones se preparan según los métodos conocidos en la química farmacéutica. Las cápsulas pueden prepararse mezclando un inhibidor de la quinasa TOR con un vehículo o diluyente adecuado y utilizando la cantidad apropiada de la mezcla para rellenar cápsulas. Los vehículos y diluyentes habituales incluyen, pero no están limitados a, sustancias en polvo inertes tales como almidón de diferentes clases, celulosa en polvo, especialmente celulosa cristalina y microcristalina, azúcares tales como fructosa, manitol y sacarosa, harinas de grano y polvos comestibles similares.

35

Los comprimidos pueden prepararse por compresión directa, por granulación húmeda o por granulación seca. Sus formulaciones incorporan habitualmente diluyentes, aglutinantes, lubricantes y disgregantes, así como el compuesto. Los diluyentes típicos incluyen, por ejemplo, varios tipos de almidón, lactosa, manitol, caolín, fosfato o sulfato de calcio, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio y azúcar el polvo. Los derivados de celulosa en polvo también son útiles. En una realización, la composición farmacéutica carece de lactosa. Los aglutinantes de comprimidos típicos son sustancias tales como como almidón, gelatina y azúcares tales como lactosa, fructosa, glucosa y semejantes. También son convenientes las gomas naturales y sintéticas, incluyendo arábica, alginatos, metilcelulosa, polivinilpirrolidina y semejantes. El polietilén glicol, la etilcelulosa y las ceras también pueden servir como aglutinantes.

40

Un lubricante podría ser necesario en una formulación de comprimidos para evitar que el comprimido y los punzones se peguen al troquel. El lubricante puede elegirse de sólidos deslizantes tales como talco, estearato de magnesio y de calcio, ácido esteárico y aceites vegetales hidrogenados. Los disgregantes de comprimidos son sustancias que se hinchan cuando se humedecen para romper el comprimido y liberar el compuesto. Incluyen almidones, arcillas, celulosas, alginas y gomas. Más particularmente, pueden usarse, por ejemplo, almidones de maíz y de patata, metilcelulosa, agar, bentonita, celulosa de madera, esponja natural en polvo, resinas de intercambio catiónico, ácido alginico, goma guar, pulpa de cítrico y carboximetil celulosa, así como lauril sulfato de sodio. Los comprimidos pueden estar recubiertos con azúcar como un saporífero y sellante o con agentes protectores formadores de película para modificar las propiedades de disolución del comprimido. Las composiciones también pueden formularse como comprimidos masticables, por ejemplo, usando sustancias tales como manitol en la formulación.

50

Cuando se desea administrar un inhibidor de la quinasa TOR como un supositorio, pueden usarse las bases típicas. La manteca de cacao es una base de supositorio tradicional, que puede modificarse por la adición de ceras para elevar su punto de fusión ligeramente. Se usan ampliamente las bases de supositorio miscibles con agua que comprenden, particularmente, polietilén glicoles de varios pesos moleculares.

55

El efecto del inhibidor de la quinasa TOR puede retrasarse o prologarse por una formulación apropiada. Por ejemplo, un gránulo lentamente soluble del inhibidor de la quinasa TOR puede prepararse e incorporarse en un comprimido o cápsula, o como un dispositivo implantable de liberación lenta. La técnica también incluye preparar gránulos de varias tasas de disolución diferentes y rellenar cápsulas con una mezcla de los gránulos. Los comprimidos o cápsulas pueden recubrirse con una película que resiste la disolución durante un periodo de tiempo predecible. Incluso las preparaciones parenterales pueden hacerse de acción duradera, disolviendo o suspendiendo el inhibidor de la quinasa TOR en vehículos aceitosos o emulsionados que le permiten dispersarse lentamente en el suero.

7. Ejemplos

7.1 Ejemplos biológicos

7.1.1 Ensayos bioquímicos

Ensayo HTR-FRET de TOR. Los siguiente es un ejemplo de un ensayo que puede usarse para determinar la actividad inhibidora de la quinasa TOR de un compuesto de ensayo. Se disolvieron los TORKi en DMSO y se prepararon como preparaciones madre 10 mM y se diluyeron apropiadamente para los experimentos. Los reactivos se prepararon como sigue:

"Tampón simple de TOR" (usado para diluir la fracción de TOR con alto contenido en glicerol): Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, 0,1 % de Tween-20, DTT 1 mM. La enzima TOR recombinante de Invitrogen (cat#PR8683A) se diluyó en este tampón hasta una concentración de ensayo de 0,200 µg/mL.

Disolución de ATP/Sustrato: ATP 0,075 mM, MnCl₂ 12,5 mM, Hepes 50 mM, pH 7,4, β-GOP 50 mM, Microcistina LR 250 nM, EDTA 0,25 mM, DTT 5 mM y 3,5 µg/mL de GST-p70S6.

Disolución del reactivo de detección: HEPES 50 mM, pH 7,4, 0,01 % de Tritón X-100, 0,01 % de BSA, EDTA 0,1 mM, 12,7 µg/mL de Cy5-αGST Amersham (Cat#PA92002V), 9 ng/mL de α-fosfo p70S6 (Thr389) (Monoclonal de Ratón de Cell Signaling #9206L), 627 ng/mL de α-ratón Eu Lance (Perkin Elmer Cat#AD0077).

A 20 µL del tampón Simple de TOR se añaden 0,5 µL del compuesto de ensayo en DMSO. Para iniciar la reacción, se añadieron 5 µL de disolución ATP/Sustrato a 20 µL de disolución del tampón Simple de TOR (control) y a la disolución de compuesto preparada anteriormente. El ensayo se paró después de 60 min añadiendo 5 µL de una disolución de EDTA 60 mM; se añadieron entonces 10 µL de disolución del reactivo de detección y la mezcla se dejó con agitación durante al menos 2 horas antes de leerla en un Lector de Microplacas Envision de Perkin-Elmer ajustado para detectar TR-FRET de Eu LANCE (excitación a 320 nm y emisión a 495/520 nm).

Los TORKi se ensayaron en el ensayo HTR-FRET de TOR y se encontró que tenían actividad en él, teniendo determinados compuestos una CI₅₀ por debajo de 10 µM en el ensayo, teniendo algunos compuestos una CI₅₀ entre 0,005 nM y 250 nM, teniendo otros una CI₅₀ entre 250 nM y 500 nM, teniendo otros una CI₅₀ entre 500 nM y 1 µM y teniendo otros una CI₅₀ entre 1 µM y 10 µM.

Ensayo ADN-PK. Los ensayos de ADN-PK se realizaron usando los procedimientos suministrados por el kit del ensayo de ADN-PK de Promega (catálogo # V7870). La enzima ADN-PK se adquirió en Promega (Promega cat#V5811).

Los TORKi seleccionados tienen, o se espera que tengan, una CI₅₀ por debajo de 10 µM en este ensayo, con algunos TORKi teniendo una CI₅₀ por debajo de 1 µM y teniendo otros una CI₅₀ por debajo de 0,10 µM.

7.1.2 Ensayos basados en células

Materiales y Métodos. Líneas celulares y cultivo celular: las líneas celulares de cáncer de pulmón humano se adquirieron en la American Type Culture Collection (ATCC) y se mantuvieron en RPMI 1640 más 10 % de suero de ternera bovino (FCS) o medio de cultivo especial recomendado por la ATCC. Las células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (panel de cáncer NSCLC) incluyen las siguientes líneas celulares NCI-H460, NCI-H838, NCI-H1792, NCI-H520, NCI-H1993, NCI-H1944, NCI-H1975, NCI-H1395, A549, NCI-H2122, NCI-H1703, NCI-H1299, NCI-H647, NCI-H358, SK-LU-1, NCI-H1734, NCI-H1693, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H2030, NCI-H1755, Calu-6, Calu-1, SW1573, NCI-H2009, NCI-H441, HOP92, NCI-H2110, NCI-H727, NCI-H1568, Calu-3, NCI-H2228, NCI-H2444, NCI-H1563, NCI-H1650, NCI-H1437, NCI-H650, NCI-H1838, NCI-H2291, NCI-H28 y NCI-H596. Las líneas celulares adicionales frente a las que pueden ensayarse los Inhibidores de la quinasa TOR incluyen HT-3, HeLaSF, HeLa S3, SKG-IIIa, SiHa, MS751, BOKU, C-33-A, C-4-II, Ca-Ski, DoTc2-4510, ME-180, OMC-1. SW756 y TC-YIK.

Ensayo de viabilidad celular. Un inhibidor de la quinasa TOR representativo ("Compuesto 1") se usó en el siguiente ensayo bioquímico. La viabilidad celular se evaluó usando el ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente Cell Titer-Glo de Promega. El ensayo es un método homogéneo para determinar el número de células viables en cultivo sobre la base de la cuantificación del trifosfato de adenosina (ATP) presente, un indicador de células metabólicamente activas. El procedimiento del ensayo homogéneo implica añadir el único reactivo (Reactivo CellTiter-Glo) directamente a las células cultivadas en medio suplementado con suero. Las células se sembraron en placas en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Número de Catálogo 33595) a densidades que se optimizaron

previamente para cada línea celular. Las células se incubaron toda la noche en 5 % CO₂ a 37 °C. Al día siguiente, se prepararon diluciones del compuesto a partir de una preparación madre 30 mM. El Compuesto 1 se diluyó en primer lugar en 100 % DMSO y después se diluyó 1:50 en medio de crecimiento. A continuación, el Compuesto 1 se añadió al pocillo apropiado a una dilución de 1:10 (es decir, se añadieron diez microlitros (10 µL) del Compuesto 1 diluido a 90 µL de medio de cultivo en cada pocillo). La dilución final del Compuesto 1 fue 1:500, que rindió una concentración final de DMSO de 0,2 % en cada pocillo. Todas las concentraciones se realizaron en triplicado. Las células se incubaron con el Compuesto 1 en 5 % CO₂ a 37 °C durante 3 días. Después de un periodo de incubación de 3 días, se añadieron 100 µL de reactivo CellTiter-Glo a cada pocillo durante 2 minutos con agitación y se incubó adicionalmente durante 10 minutos (sin agitación) a temperatura ambiente para estabilizar la señal. La luminiscencia se midió en el lector de placas multi marcaje VICTOR X2. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó usando la respuesta del control de DMSO como 100 % del crecimiento celular en la misma placa. Los valores promedio de triplicados se representaron gráficamente para obtener los valores de CI₅₀ usando el software XLfit de IDBS. La fórmula usada para determinar las CI₅₀ en XLfit fue el número de modelo 205, que utiliza un Modelo Logístico de 4 Parámetros o Modelo de Respuesta a la Dosis Sigmoidal para calcular los valores de CI₅₀. Todos los valores de CI₅₀ se indican como un promedio bien de dos o tres experimentos independientes.

Análisis de la expresión de la proteína LKB1. Se prepararon lisados completos en tampón de ensayo de radio-inmunoprecipitación [10 mmoles/L de Tris (pH 7,4), 100 mmoles/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA, 1 mmol/L de EGTA, 1 mmol/L de NaF, 20 mmoles/L de Na₄P₂O₇, 2 mmoles/L de Na₃CO₄, 0,1 % SDS, 0,5 % desoxicolato de sodio, 1 % Tritón X-100, 10 % glicerol] que contenía inhibidores de proteasas. Los lisados celulares que contenían 50 µg de proteína se fraccionaron en geles de Nu-PAGE[®] al 4-12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con un anticuerpo anti-LKB1 (#3050, Cell Signaling Technology) toda la noche a 4 °C. La membrana se lavó tres veces con PBS + 0,1 % Tween antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con PBS + 0,1 % Tween antes del escaneo en el escáner LI-COR Odyssey[®] a las longitudes de onda de 700 nm y 800 nm.

Análisis estadístico. La correlación entre los valores de CI₅₀ a lo largo de diferentes estados de mutación se evaluó usando bien el ensayo de Wilcoxon, en el que el número de grupos es igual a 2, o el ensayo de Kruskal-Wallis, en el que el número de grupos es mayor de 2. Un valor p < 0,05 se considera como una correlación significativa.

Análisis de la expresión de la proteína fosfo AMPK T172. Se prepararon lisados completos en tampón de ensayo de radio-inmunoprecipitación [10 mmoles/L de Tris (pH 7,4), 100 mmoles/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA, 1 mmol/L de EGTA, 1 mmol/L de NaF, 20 mmoles/L de Na₄P₂O₇, 2 mmoles/L de Na₃CO₄, 0,1 % SDS, 0,5 % desoxicolato de sodio, 1 % Tritón X-100, 10 % glicerol] que contenía inhibidores de proteasas. Los lisados celulares que contenían 50 µg de proteína se fraccionaron en geles de Nu-PAGE[®] al 4-12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con anti-fosfo-AMPK T172 (#4188, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) anti-AMPK alfa (#2793, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y anti β-actina (#1978, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) toda la noche a 4 °C. La membrana se lavó tres veces con PBS + 0,1 % Tween antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con PBS + 0,1 % Tween antes del escaneo en el escáner LI-COR Odyssey[®] a las longitudes de onda de 700 nm y 800 nm. Los niveles de pAMPK T172, AMPK y actina se cuantificaron usando software LI-COR Odyssey[®]. La relación de pAMPK T172 frente a actina (pAMPK/actina) se aplicó a análisis estadístico Wilcoxon.

Análisis estadístico. La correlación entre el nivel de expresión de fosfo-AMPK T172 y el estado del nivel de expresión de la proteína LKB1 se evaluó usando el ensayo de Wilcoxon. El estado del nivel de expresión de la proteína LKB1 se definió como "Neg" o "Pos" sobre la base de los resultados de la transferencia Western. Un valor p < 0,05 se considera como una correlación significativa.

7.1.3 Modelos de xenoinjerto

Se propagan muestras tumorales de biopsias primarias de pacientes en animales inmunocomprometidos para crear un modelo animal que pueda asemejarse lo más posible a la enfermedad humana (p. ej., John *et al*, *Clin. Cancer Res.* 17(1):134-141 (2011); de Plater *et al*, *Br. J. Cancer* 103(8): 1192-1200 (2010)). Los tumores de biopsias de pacientes con cáncer de pulmón propagados *in vivo* se caracterizan por el estado mutacional de LKB1 por técnicas de secuenciación génica. Además, la expresión de la proteína en estas muestras se analiza por técnicas de transferencia Western, IHC o IF. Se eligen cuatro de estos modelos animales de cáncer, dos que expresan LKB1 de tipo salvaje y dos que expresan LKB1 mutante, para confirmar que los modelos tumorales de LKB1 mutante son más sensibles a la inhibición de TORC1 comparados con los de tipo salvaje. Un compuesto como se describe en la presente memoria (p. ej., el Compuesto 1) se ensaya en estos modelos de xenoinjerto derivados de biopsias de cáncer humano primarias, por ejemplo, biopsias de cáncer de pulmón. Los compuestos proporcionados en la presente memoria muestran o se espera que muestren una actividad incrementada en los modelos de xenoinjerto que expresan LKB1 mutante.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la quinasa TOR para uso en un método para tratar carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el método comprende administrar el inhibidor de la quinasa TOR a un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers caracterizado por una pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de este farmacéuticamente aceptable.
2. El inhibidor de la quinasa TOR para uso de la reivindicación 1, en el que el método comprende además cribar el carcinoma del paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, el cáncer del paciente que tiene cáncer del cuello uterino o el paciente que tiene Síndrome de Peutz-Jeghers para detectar la presencia de la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje.
3. Un método para predecir la probabilidad de que un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers responda a terapia con un inhibidor de la quinasa TOR, que comprende cribar el carcinoma del paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, el cáncer del paciente que tiene cáncer del cuello uterino o el paciente que tiene Síndrome de Peutz-Jeghers para detectar la presencia de pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje, en el que la presencia de la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 predice una probabilidad incrementada de que la terapia con un inhibidor de la quinasa TOR tratará dicho carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de este farmacéuticamente aceptable.
4. Un kit que comprende uno o más contenedores llenos con (a) un inhibidor de la quinasa TOR o una composición farmacéutica de este, (b) reactivos para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1, respecto al tipo salvaje, en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral y (c) instrucciones para detectar la pérdida de o mutación en el gen o proteína LKB1 en el cáncer de un paciente o en un paciente que tiene un síndrome tumoral, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de este farmacéuticamente aceptable.
5. Un inhibidor de la quinasa TOR para uso en un método para tratar carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el método comprende administrar el inhibidor de la quinasa TOR y uno o más agentes seleccionados de 2-desoxiglucosa, merformina, fenformina y pemetrexed a un paciente que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello uterino o Síndrome de Peutz-Jeghers, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de este farmacéuticamente aceptable.
6. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la quinasa TOR, uno o más agentes seleccionados de 2-desoxiglucosa, merformina, fenformina y pemetrexed y un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el inhibidor de la quinasa TOR es 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-(*trans*-4-metoxiciclohexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-*b*]pirazin-2(1H)-ona o una sal, clatrato, solvato, estereoisómero o tautómero de este farmacéuticamente aceptable.

Línea celular NSCLC	Estado Mutacional	Mutación en LKB1	Presencia de la Proteína LKB1	n	CI ₅₀ Media Compuesto 1 (μM)
A549	Mutante	p.Q37*	Neg	2	0,772
H1395	Mutante	p.E57fs*7	Neg	2	0,599
H1734	Mutante	p.M51fs*14	Neg	2	1,551
H1755	Mutante	p.P281fs*6	Neg	3	0,374
H1993	Mutante	p.E199*	Neg	2	0,504
H2030	Mutante	p.E317*	Neg	2	2,256
H2122	Mutante	p.P281fs*6	Neg	3	0,403
H23	Mutante	p.W332*	Neg	2	2,205
H460	Mutante	p.Q37*	Neg	2	0,373
H838	Mutante	p.T212fs*75	Neg	3	0,489
H1568	Desconocido		Neg	3	0,226
H1944	Desconocido		Neg	3	0,318
H2110	Desconocido		Neg	3	0,456
H2444	Desconocido		Pos	3	0,778
H647	Desconocido		Neg	2	1,355
CALU-1	WT		Pos	2	4,744
CALU-3	WT		Pos	3	0,302
CALU-6	WT		Pos	2	4,52
H1299	WT		Pos	2	1,227
H1437	WT		Neg	3	0,975
H1563	WT		Neg	3	>30
H1650	WT		Pos	3	>30
H1693	WT		Pos	3	0,639
H1703	WT		Pos	2	0,917
H1792	WT		Pos	3	0,382
H1838	WT		Pos	3	>30
H1975	WT		Pos	3	0,568
H2009	WT		Pos	3	>30
H2228	WT		Pos	3	0,264
H226	WT		Pos	2	1,747
H2291	WT		Pos	3	>30
H28	WT		Pos	3	>30
H358	WT		Pos	2	1,418
H441	WT		Pos	3	>30
H520	WT		Pos	2	0,499
H596	WT		Pos	3	2,196
H650	WT		Pos	3	>30
H727	WT		Neg	3	0,288
HOP-62	WT		Pos	3	2,007
HOP-92	WT		Pos	3	>30
SK-LU-1	WT		Pos	3	0,402
SW-1573	WT		Pos	3	>30

FIG. 1A

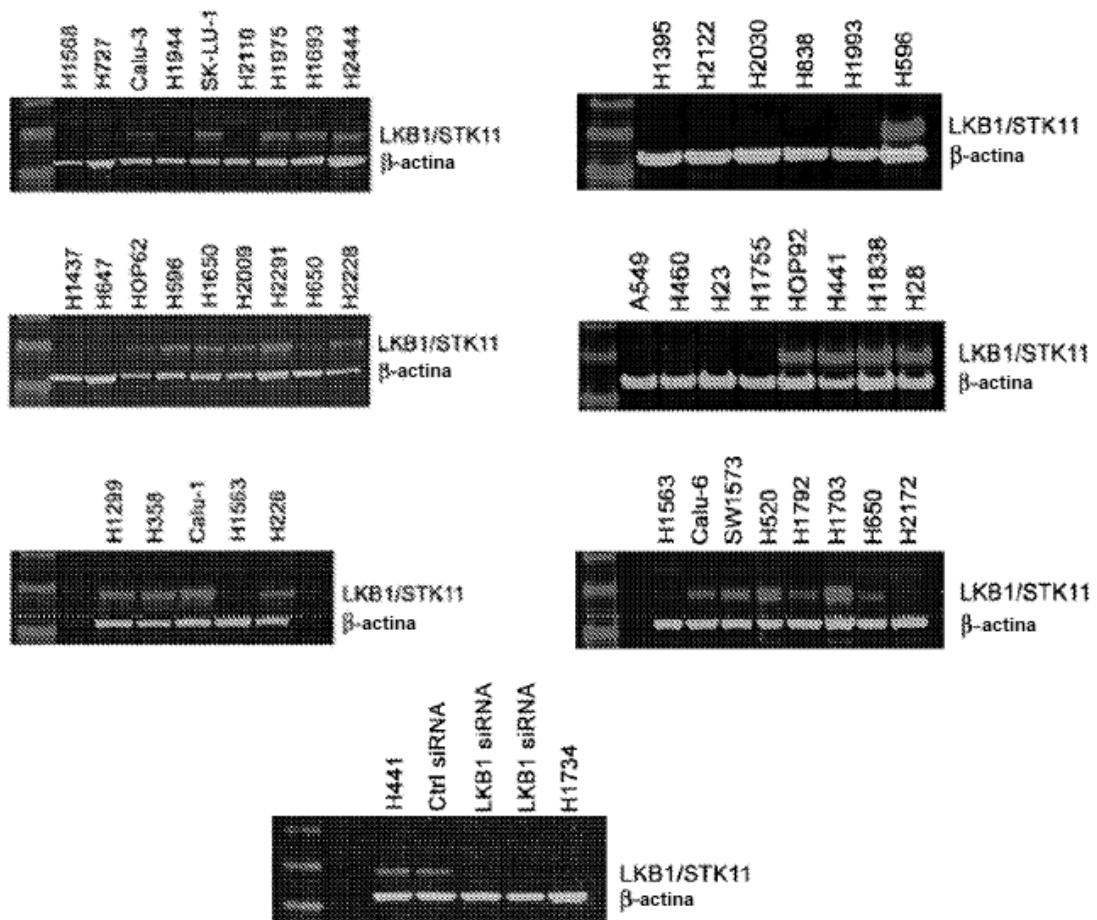
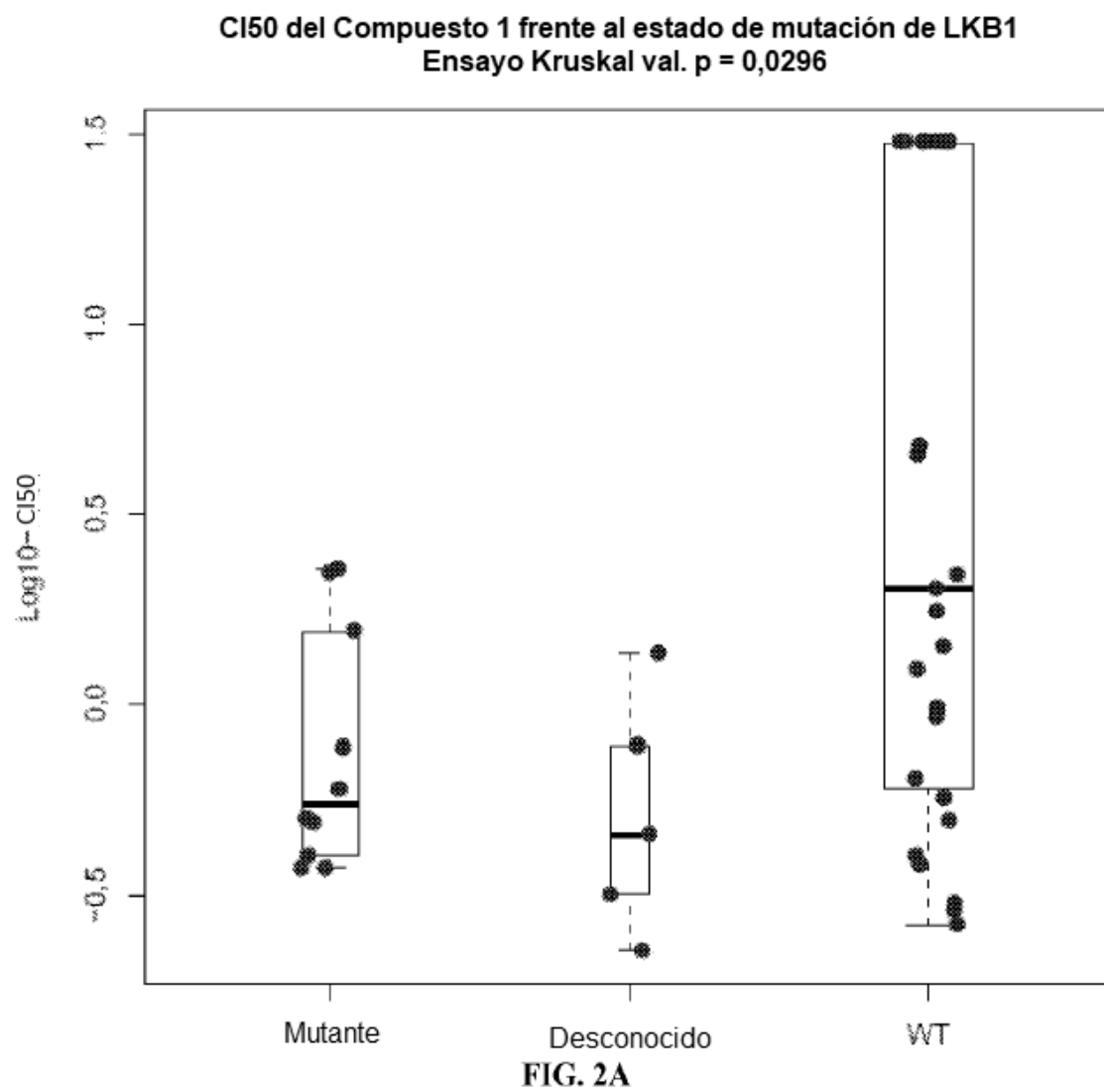
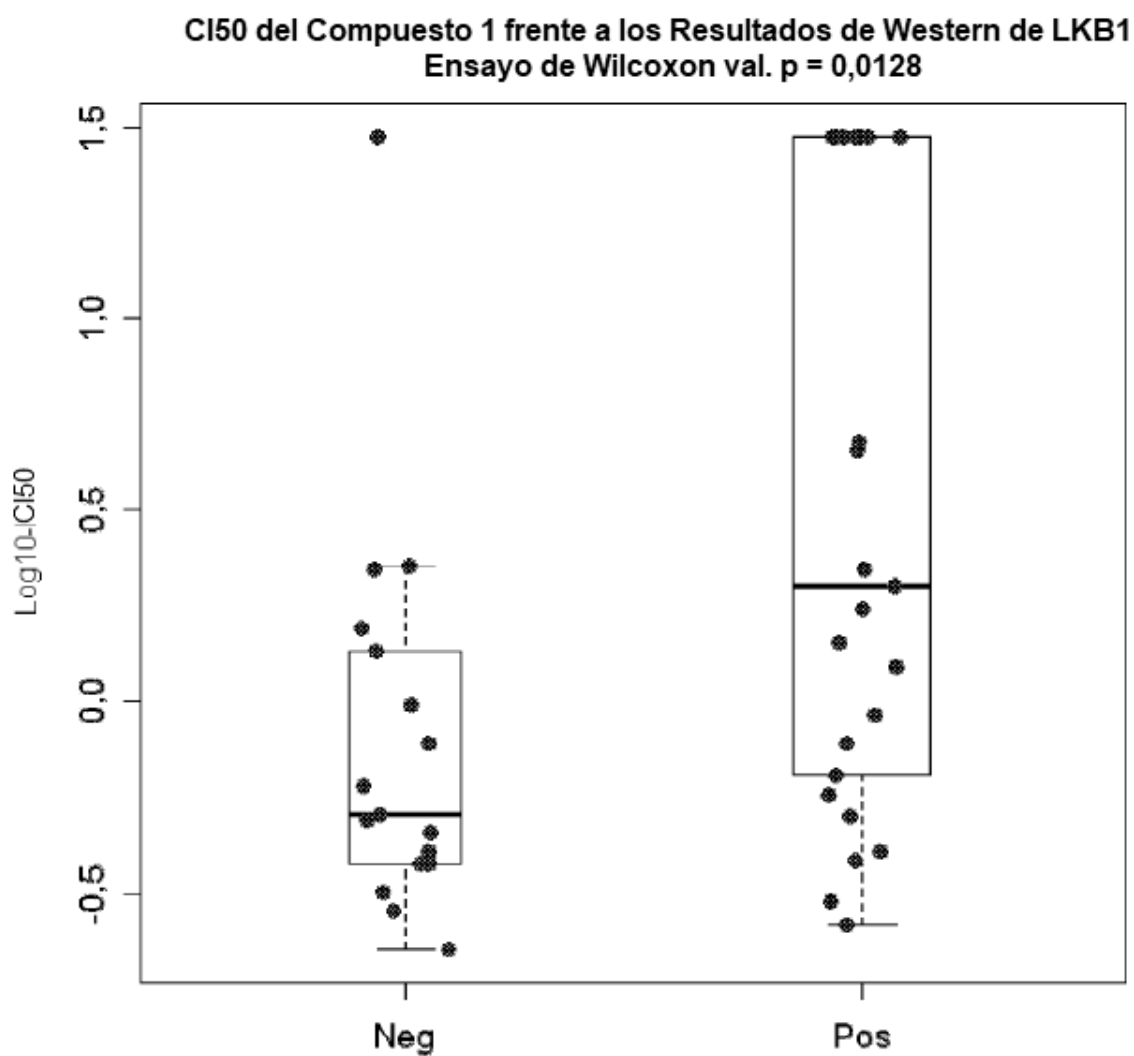


FIG. 1B



**FIG. 2B**

	Sensible al Compuesto 1 (número de líneas celulares)	Menos sensible al Compuesto 1 (número de líneas celulares)
LKB1 Pos	16	9
LKB1 Neg	16	1

Ensayo de Fischer: valor p = 0,03 (<0,05)

Ensayo de Wilcoxon valor p = 0,0128 (<0,05)

FIG. 2C

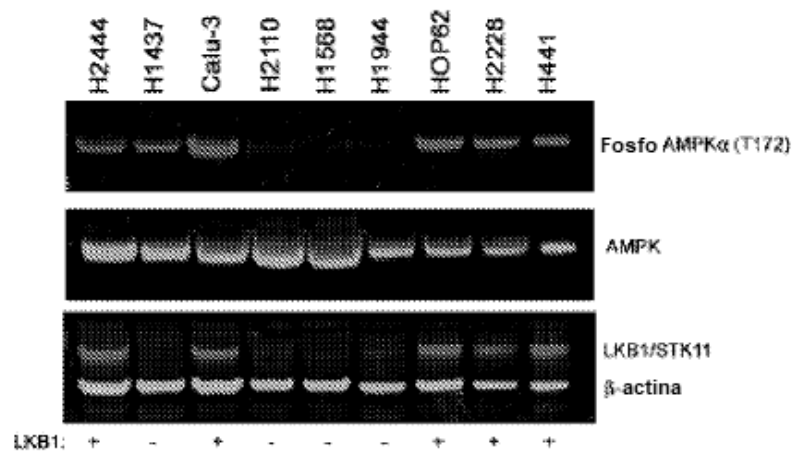


FIG. 3A

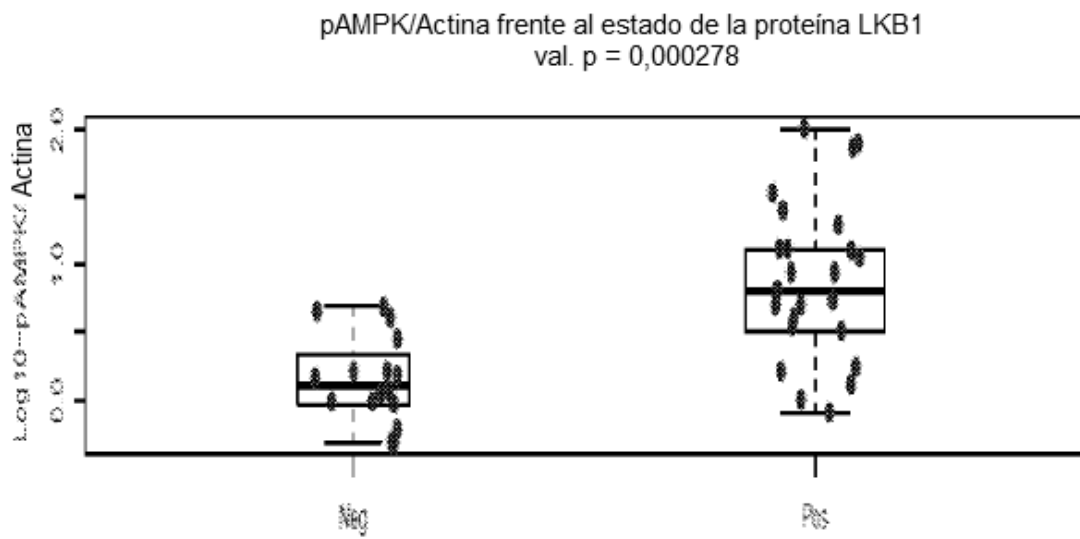


FIG. 3B