

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 233**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/GB2012/051290**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12168721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12728113 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2718436**

54 Título: **Materiales y métodos para tratar el cáncer con PTEN deficiente o mutado**

30 Prioridad:

10.06.2011 GB 201109966
10.06.2011 US 201161495602 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2018

73 Titular/es:

**THE INSTITUTE OF CANCER RESEARCH: ROYAL
CANCER HOSPITAL (100.0%)
123 Old Brompton Road
London Greater London SW7 3RP, GB**

72 Inventor/es:

**ASHWORTH, ALAN;
LORD, CHRISTOPHER JAMES;
BROUGH, RACHEL y
FRANKUM, JESSICA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 671 233 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

Materiales y métodos para tratar el cáncer con PTEN deficiente o mutado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a materiales y métodos para tratar el cáncer con PTEN deficiente o mutado utilizando inhibidores de cinasa mitótica, y a métodos para explorar agentes para el tratamiento del cáncer con PTEN deficiente o mutado.

10

Antecedentes de la invención

En el centro del diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer es la identificación de genes que son críticos para la supervivencia de las células tumorales pero que son enormemente redundantes en las células normales. La correlación de los cambios moleculares con la tumorigénesis ha proporcionado una vía para la identificación de dianas potenciales de fármacos y proporciona el razonamiento de los esfuerzos para caracterizar la variación genética y la expresión genética en los tumores. Sin embargo, la naturaleza correlativa de estos datos significa que frecuentemente no es posible determinar si las observaciones son la causa o simplemente un efecto del estado de enfermedad. Por ejemplo, las células tumorales presentan generalmente cualquiera de entre 10^4 y 10^5 cambios genéticos en comparación con el ADN de la línea germinal pero las estimaciones teóricas sugieren que solo pocas de estas mutaciones (probablemente menos de 10) son directoras críticas de la formación tumoral y supervivencia (revisado en (1)).

15

20

25

30

Brough et al. (Current Opinion in Genetics & Development 2011, 21:34-41) describen cómo el concepto biológico de enfermedad sintética/letalidad (SSL) se puede utilizar para identificar nuevas estrategias terapéuticas y dianas en modelos desde levaduras a células humanas. Se sabe que los genes diana que se sobre-expresan en formas particulares de cáncer. Sin embargo, a pesar de estos éxitos, el desarrollo de fármacos que destruyan selectivamente las células cancerosas sin dañar las células normales sigue siendo un desafío considerable. Este proceso es particularmente problemático cuando se considera como dirigir una proteína tal como un supresor tumoral disfuncional que o está muy inactivo o incluso completamente ausente. Si un gen en una relación SSL es un gen supresor tumoral, entonces su pareja sintética letal se convierte en una diana terapéutica candidata que se podría utilizar en las células tumorales con una disfunción definida de un gen supresor tumoral. La SSL puede producirse entre genes que actúan en la misma ruta bioquímica o en distintas rutas, pero compensatorias.

35

40

El documento WO 2012/000103 se refiere al direccionamiento de cáncer con mutaciones de PTEN con antagonistas de la PLK4. Harrington et al. (Nature Medicine, 10(3): 262-267, 2004) describe el VX-680, un inhibidor de molécula pequeña de Aurora cinasas. Song et al. (Cell, 144: 187-199, 2011) hacen referencia a PLK1 y Aurora cinasas como dianas para la inhibición en el tratamiento del cáncer con PTEN mutado. El documento WO 2010/007756 describe una serie de compuestos para inhibir la TTK para el tratamiento del cáncer. El documento US 2011/0002923 describe el uso de un antagonista de la TTK para el tratamiento de cáncer de mama específicamente positivo a HER-2. El documento US 2003/0045491 describe un método para reducir el crecimiento de una célula cancerosa poniéndola en contacto con un agente que reduce la actividad de la TTK. No se hace mención del uso de inhibidores de la TTK en el tratamiento de cánceres con PTEN mutado o deficiente en estos documentos.

45

50

En el cáncer de mama, la definición de genes críticos implicados en la supervivencia de las células tumorales puede dar lugar en algunos casos al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la enfermedad, el ejemplo reciente más notable es el desarrollo de agentes tales como trastuzumab y lapatinib, que se dirige a la dependencia de algunos tumores de mama al oncogén ERBB (2). Sin embargo, a pesar de la abundancia de caracterización molecular, genética e histológica de los tumores y modelos de líneas celulares, nuestro entendimiento de las dependencias genéticas en cánceres tales como el cáncer de mama, sigue siendo muy poco. En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de nuevas estrategias terapéuticas, en particular las que se dirigen a dependencias genéticas de diferentes formas de cáncer encontrando cales del gran número de genes mutados en diferentes formas de cáncer son críticas para la formación de tumores y la supervivencia.

55

Sumario de la invención

En general, la presente invención se basa en el trabajo que intenta definir exhaustivamente las dependencias genéticas de un conjunto de genes potencialmente "tratables farmacológicamente" en un amplio rango de modelos de líneas celulares tumorales. En su realización, los inventores no solo reafirman el impacto de la señalización de la PI3-cinasa y ERBB2 en el cáncer de mama, sino que identifican de manera importante nuevas dependencias genéticas para subconjuntos genéticamente definidos de cáncer. En particular, la presente invención se basa en los experimentos descritos en el presente documento en los que la inhibición de una cinasa mitótica, tal como la proteína cinasa TTK, es eficaz para el tratamiento de cáncer con PTEN mutado o deficiente.

60

65

El homólogo de fosfatasa y tensina ("PTEN") es un gen que se ha identificado como un supresor tumoral mediante la acción de su producto fosfatasa y está mutado en un gran número de cánceres con alta frecuencia. La proteína que

codifica este gen es una fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa. contiene un dominio tipo tensina, así como un dominio catalítico similar al de las proteína tirosina fosfatasas de especificidad dual. A diferencia de la mayoría de las proteína tirosina fosfatasas, esta proteína desfosforila preferentemente sustratos fosfoinositida. Regula negativamente los niveles intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato en las células y funciona como un supresor tumoral regulando negativamente las rutas de señalización AKT/PKB y mTOR. El informe HUGO Gene Symbol para PTEN se puede encontrar en http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=9588, que proporciona enlaces a las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de PTEN, así como la referencia a las proteínas homólogas murinas y de rata. Las cinasas mitóticas son un grupo establecido de proteína implicadas en la regulación de los puntos de control celulares, véase Nigg (Nature Reviews, 2: 21-31, 2001). La cinasa mitótica que se pueden dirigir en todos los aspectos de la presente es la TTK, que se expone en la siguiente tabla.

| | Consulta | ID del gen | Símbolo | Nombre | ID de UniProt |
|---|----------|--|---------|---|-------------------------------------|
| 1 | AURKA | <u>ENSG00000087586</u> | AURKA | Serina/treonina-proteína cinasa 6 (EC 2.7.11.1)(Aurora cinasa A) (Aurora-A) (Serina/treonina cinasa 15) (cinasa 1 relacionada con Aurora/IPL1)(cinasa 1 relacionada con Aurora) (hARK1) (cinasa amplificada en tumores de mama) | <u>A3KFJ2 HUMAN</u> |
| 2 | TTK | <u>ENSG00000112742</u> | TTK | cinasa TTK de especificidad dual (EC 2.7.12.1) (treonina-proteína cinasa que escoge fosfotirosina) (PYT) | <u>A8K8U5 HUMAN</u> |
| 3 | CDK4 | <u>ENSG00000135446</u> | CDK4 | proteína cinasa 4 de división celular(EC 2.7.11.22) (cinasa 4 dependiente de ciclina) (PSK-J3) | <u>Q6LC83 HUMAN</u> |
| 4 | PLK4 | <u>ENSG00000142731</u> | PLK4 | Serina/treonina-proteína cinasa PLK4 (EC 2.7.11.21) cinasa 4 tipo polo) (PLK-4) (Serina/treonina-proteína cinasa Sak) (Serina/treonina-proteína cinasa 18) | <u>Q15455 HUMAN</u> |
| 5 | BUB1B | <u>ENSG00000156970</u> | BUB1B | serina/treonina-proteína cinasa de punto de control mitótico BUB1 beta (EC 2.7.11.1) (proteína cinasa relacionada con MAD3/BUB1) (hBUBR1) (cinasa MAD3L de punto de control mitótico)(Proteína SSK1) | <u>C9JLW5 HUMAN</u> |
| 6 | PLK1 | <u>ENSG00000166851</u> | PLK1 | Serina/treonina-proteína cinasa PLK1 (EC 2.7.11.21) (cinasa 1 tipo polo)(PLK-1) (Serina/treonina-proteína cinasa 13) (STPK13) | <u>PLK1 HUMAN</u> |
| 7 | CDC2 | <u>ENSG00000170312</u> | CDC2 | proteína 2 homóloga de control de división celular (EC 2.7.11.22) (EC 2.7.11.23) (proteína p34. cinasa) cinasa 1 dependiente de ciclina) (CDK1) | <u>C9J497 HUMAN</u> |
| 8 | PLK3 | <u>ENSG00000173846</u> | PLK3 | Serina/treonina-proteína cinasa PLK3 (EC 2.7.11.21) cinasa 3 tipo polo)(PLK-3) (serina/treonina-proteína cinasa inducible por citocina) (cinasa inducible por FGF) (cinasa relacionada con proliferación) | <u>PLK3 HUMAN</u> |
| 9 | AURKB | <u>ENSG00000178999</u> | AURKB | Serina/treonina-proteína cinasa 12 (EC 2.7.11.1) (Aurora-B)(proteína 1 asociada con cuerpo medio tipo Aurora e Ipl1) (AIM-1) (cinasa 2 relacionada con Aurora/IPL1) (cinasa 2 relacionada con Aurora)(STK-1) | <u>B2RC06 HUMAN</u> |

Un ejemplo preferido de una cinasa mitótica, cuyos inhibidores se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de cáncer con PTEN mutado o deficiente, es la proteína cinasa TTK. Esta cinasa es una proteína cinasa de especificidad dual con la capacidad para fosforilar la tirosina, serina y treonina. La TTK se asocia con la proliferación celular y es esencial para el alineamiento cromosómico en el centrómero durante la mitosis y es necesaria para la duplicación del centrosoma. Se ha descubierto que es una proteína de punto de control mitótico para la segregación precisa de los cromosomas durante la mitosis. El informe HUGO Gene Symbol para TTK puede encontrarse en http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=12401, que proporciona enlaces a las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la TTK, así como hace referencia a las proteínas homólogas murinas y de rata.

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención se proporciona un inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene cáncer inhibiendo dicha proteína cinasa TTK, en el que el cáncer es un cáncer con el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) mutado o deficiente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de selección de agentes útiles en el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente, empleando el método una primera y segunda líneas celulares, en el que la primera línea celular es PTEN y la segunda línea celular tiene PTEN competente, comprendiendo el método:

- 5
- (a) poner en contacto la primera y segunda líneas celulares de mamífero con al menos un agente candidato;
 - (b) determinar la cantidad de celular muertas en la primera y segunda líneas celulares;
 - (c) seleccionar un agente candidato que es sintéticamente letal por la primera línea celular; y
 - (d) determinar si el agente candidato seleccionado en la etapa (c) es un inhibidor de la proteína cinasa TTK.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de exploración de agentes útiles en el tratamiento de cáncer con PTEN mutado o deficiente, comprendiendo el método:

- 15
- (a) poner en contacto la proteína cinasa TTK con al menos un agente candidato;
 - (b) determinar un efecto de al menos un agente candidato sobre la actividad de la proteína cinasa TTK; y
 - (c) seleccionar un agente candidato que inhiba la actividad de la cinasa mitótica que sea útil para el tratamiento del cáncer con el PTEN mutado o deficiente.

20 En algunos aspectos, la presente invención proporciona un método que comprende la identificación de un agente candidato útil para el tratamiento del cáncer con PTEN mutado o deficiente de acuerdo con un método como se describe en el presente documento, la etapa adicional de fabricación del compuesto al por mayor y/o la formulación del agente en una composición farmacéutica.

25 La presente invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritas excepto cuando dicha combinación claramente no es permisible o se establece que se evite expresamente. Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora mediante ejemplos y sin limitación en referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

30 **Figura 1. Efectos de la dependencia del oncogén PIK3CA y ERBB2 en el cáncer de mama confirmados mediante perfil de viabilidad funcional.** a. mapa caliente que muestra los resultados de un agrupamiento supervisado por valoraciones Z de ARNip. Las líneas celulares de tumor de mama se agruparon según es estado de mutación genética de PIK3CA y los efectos diferenciales entre el PIK3CA mutante y los grupos de tipo silvestre utilizando el ensayo de permutación de la mediana. Se muestran los efectos estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Para cada ARNip se muestran los valores de p y el umbral de $p < 0,05$ a la derecha del mapa caliente. El ARNip que se dirige a PIK3CA se marca con la flecha. b. Diagrama de cascada y caja/bigotes de valoraciones Z de ARNip PIK3CA a lo largo del panel de la línea celular de tumor de mama. En el diagrama caja/bigotes, $*p = 0,014$ entre los grupos de PIK3CA mutante y de tipo silvestre utilizando el ensayo de permutación de la mediana. c. Diagramas de caja/bigotes de valoraciones Z de ARNip AKT2 y AKT3 en modelos de PIK3CA mutante y de tipo silvestre ($*p = 0,047$ y $p = 0,003$ respectivamente utilizando el ensayo de permutación de mediana). d. Mapa caliente que muestra los resultados de un agrupamiento supervisado de valoraciones Z de ARNip de acuerdo con el estado de amplificación de ERBB2 en el panel de línea celular de tumor de mama. Se muestran los efectos estadísticamente significativos ($p < 0,05$, ensayo de permutación de medianas). Los ARNip de ERBB2 y PIK3CA están marcados por flechas. e. Diagramas de cascada y de caja/bigotes de puntuaciones Z de ARNip a lo largo del panel de línea celular de tumor de mama. En el diagrama de caja/bigotes, $*p = 0,003$ entre grupos de ERBB2 amplificado y no amplificado utilizando el ensayo de permutación de medianas.

50 **Figura 2. La inhibición de la TTK es selectiva de PTEN.** a. Mapa caliente que muestra los resultados de un agrupamiento supervisado de puntuaciones Z ARNip. Las líneas celulares de tumor de mama se agruparon de acuerdo con el estado de mutación del gen PTEN y se identificaron los efectos diferenciales entre los grupos de PTEN mutante y de tipo silvestre utilizando el ensayo de permutación de medianas. Se muestran los efectos estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Para cada ARNip se muestran los valores de p y el umbral de $p < 0,05$ a la derecha del mapa de calor. El ARNip que se dirige a TTK está marcado con la flecha. b. Diagramas en cascada y de caja/bigotes de valoraciones Z de ARNip de la TTK a lo largo del panel de línea celular de tumor de mama. En el diagrama de caja/bigotes, $*p = 0,0012$ entre los grupos de PTEN mutante y de tipo silvestre utilizando el ensayo de permutación de mediana. c. d. Datos de la fracción de supervivencia a partir de dos modelos de PTEN mutante/tipo silvestre isogénico derivados independientemente transfectados con ARNip que se dirigen a TTK. Las fracciones de supervivencia se determinaron siete días después de la transfección. $*p < 0,05$ (ensayo t de Student). e, f. Datos de la fracción de supervivencia de dos modelos de PTEN mutante/tipo silvestre isogénico derivados independientemente expuestos a dos inhibidores de la TTK químicamente distintos (AZ3146 o CCT132774). La fracción de supervivencia se determinó a partir de dos después de siete días de exposición al inhibidor. En cada caso la estadística de las diferencias en ANOVA de dos vías en las curvas de supervivencia es $p < 0,0001$.

65 **Figura 3. Agrupamiento jerárquico de líneas celulares de tumor de mama de acuerdo con los perfiles de viabilidad funcional.** a. Mapa caliente de los datos de viabilidad funcional de la línea celular de tumor de mama.

Se utilizaron los datos de valoración Z de los ARNip que producen $Z < -2$ en dos o más líneas celulares. Los valores de p para el pvclust aproximadamente sin tendencia (au) eran 0,92 y 0,91 para el Grupo 1 y 2, respectivamente. **b.** Sumario del agrupamiento jerárquico. El Grupo 1 estaba enriquecido significativamente con líneas celulares de tumor de mama con PTEN mutante ($p = 0,0016$), mientras que el Grupo 2 estaba enriquecido significativamente con líneas celulares de tumor de mama con PIK3CA mutante ($p = 0,038$). Los valores de p se utilizaron el ensayo del chi cuadrado.

Descripción detallada

10 *Inhibidores*

Los compuestos que se pueden emplear o explorar para su uso como inhibidores de cinasas mitóticas de acuerdo con la presente invención para tratar el cáncer con PTEN mutante o deficiente. Algunos inhibidores de estos polipéptidos son conocidos y se pueden encontrar ejemplos adicionales mediante la aplicación de tecnologías de exploración para estas dianas.

Inhibidores de molécula pequeña

A modo de ejemplo, los inhibidores de la TTK incluyen moléculas pequeñas biodisponibles por vía oral (PMID: 20383151) (PMID: 21159646). Primariamente, se había propuesto que los inhibidores de la TTK son selectivos en tumores definidos por altos niveles de inestabilidad cromosómica (CIN) (PMID: 16921376) y se ha demostrado que son eficaces en numerosos tipos de cáncer (PMID: 21159646). Como se ha descubierto que otros componentes de punto de control de ensamblaje del huso (SAC) están regulados positivamente en una amplia variedad de tumores, se ha sugerido que estos cánceres se han convertido en dependientes de la función de SAC y se necesita el punto de control mitótico para sostener su proliferación en presencia de aneuploidía (PMID: 17439397, PMID: 19269363, PMID: 18469805, PMID: 18383837). Se desvelan inhibidores de la TTK adicionales en los documentos WO 2010/007756, US 2011/0002923 y US 2003/0045491. Estos pueden ser adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención incluso aunque las aplicaciones respectivas no desvelan el uso de estos inhibidores de la TTK en el tratamiento de cánceres con el PTEN mutante o deficiente. Los inhibidores incluyen los compuestos AZ3146 o CCT132774 utilizando en los ejemplos posteriores.

Sin embargo, se han identificado inhibidores de la cinasa mitótica adicionales mediante el uso de estrategias de exploración de alto rendimiento.

La presente invención también se extiende al uso de inhibidores de molécula pequeña descubiertos en la exploración desvelada en el presente documento y a derivados que son compuestos de estructura y funcionalidad similares a los compuestos descubiertos en la exploración de alto rendimiento, pero con una o más modificaciones, de los que se espera que tengan efectos fisiológicos similares a estos compuestos y podrían por lo tanto utilizarse también en el tratamiento del cáncer con PTEN mutado o deficiente. Los métodos de exploración de la invención se pueden utilizar para explorar bibliotecas de dichos derivados para optimizar su actividad, si fuera necesario.

Los derivados se pueden diseñar, basándose en un compuesto líder, modificando uno o más sustituyentes o grupos funcionales en comparación con el compuesto líder, por ejemplo, reemplazando estos con sustituyentes alternativos o grupos que se espera que tengan el mismo efecto fisiológico o mejorado. El uso de derivados que tienen dichas modificaciones es bien conocido por los expertos en la técnica.

Anticuerpos

Se pueden emplear los anticuerpos en la presente invención como un ejemplo de una clase de inhibidor útil para el tratamiento del cáncer con el PTEN mutado o deficiente, y más particularmente como inhibidores de cinasa mitótica tal como los inhibidores de la proteína cinasa TTK. También se pueden utilizar en el método desvelados en el presente documento para evaluar un individuo que tiene un cáncer o predecir la respuesta de un individuo que tiene cáncer, en particular para la determinación de si el individuo tiene un cáncer con el PTEN mutado o deficiente que puede ser tratable de acuerdo con la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye una inmunoglobulina sea natural o producida sintéticamente parcial o completamente. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un dominio de unión de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión al antígeno tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos. Es posible tomar anticuerpos monoclonales u otros y utilizar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que mantengan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo para las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones marco conservadas, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0 184 187 A, GB 2,188,638 A o EP 0 239 400 A.

Los anticuerpos se pueden modificar de varias maneras y se debería considerar la expresión "molécula de

anticuerpo" como que cubre cualquier miembro o sustancia de unión específica que tiene un dominio de unión al antígeno de anticuerpo con la especificidad necesaria. Por lo tanto, esta expresión cubre fragmentos y derivados de anticuerpo, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, sea natural o completa o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden llevar a cabo la función de unión a los antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo sencillo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) MOLÉCULA Fv de cadena sencilla (scFv), en el que un dominio VH y un dominio VL están unidos por enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al, Science, 242: 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85: 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento WO 93/11161) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión genética (documento WO 94/13804; Holliger et al, P.N.A.S. USA, 90: 6444-6448, 1993); (x) inmunoadhesinas (documento WO 98/50431). Las moléculas Fv, scFv o de diacuerpo se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que comprende los dominios VH y VL (Reiter et al, Nature Biotech, 14: 1239-1245, 1996). También se pueden fabricar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu et al, Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996).

Los anticuerpos preferidos utilizados de acuerdo con la presente invención están aislados, en el sentido de que están libres de contaminantes tales como anticuerpos que son capaces de unirse otros polipéptidos y/o componentes libres de suero. Se prefieren los anticuerpos monoclonales para algunos fines, aunque los anticuerpos policlonales están en el alcance de la presente invención.

Las reactividades de los anticuerpos en una muestra se pueden determinar por cualquier medio apropiado. El marcado con moléculas indicadoras individuales es una posibilidad. Las moléculas indicadoras pueden generar directa o indirectamente señales detectables y preferentemente medibles. La unión de moléculas indicadoras puede ser directamente o indirectamente, covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace peptídico o no covalentemente. La unión mediante un enlace peptídico puede ser como resultado de la expresión recombinante de una fusión genética que codifica un anticuerpo y una molécula indicadora. Un modo favorecido es por unión covalente de cada anticuerpo con un fluorocromo individual, fósforo o colorante que se excita por láser con características de absorción o emisión aisladas espectralmente. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, Rojo Texas. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen la diaminobenzidina.

Otros informes incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado tales como perlas de látex que están coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes activos biológica o químicamente que pueden producir directa o indirectamente señales que se observan visualmente, se detectan electrónicamente o se registran de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que desarrollan un cambio de color o produce cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo, Pueden ser molecularmente excitables, de manera que las transiciones electrónicas entre los estados de energía dan como resultado absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas utilizadas en conjunción con biosensores. Se pueden emplear sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en la exploración de la presencia de un polipéptido, por ejemplo, en una muestra de ensayo que contiene células o un lisado celular como se ha expuesto, y se pueden utilizar en la purificación y/o aislamiento de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, a continuación de la producción del polipéptido mediante la expresión de un ácido nucleico codificante. Los anticuerpos pueden modular la actividad del polipéptido al que se unen y de esta manera, si ese polipéptido tiene un efecto perjudicial para un individuo puede ser útil en un contexto terapéutico (que puede incluir la profilaxis).

Fragmentos peptídicos

Otra clase de inhibidores útiles para tratar un cáncer con el PTEN mutado o deficiente incluye los fragmentos peptídicos que interfieren la actividad de una cinasa mitótica tal como la proteína cinasa TTK. Los fragmentos peptídicos se pueden generar completa o parcialmente mediante síntesis química que bloquean los sitios catalíticos de la cinasa. Los fragmentos peptídicos pueden prepararse fácilmente de acuerdo con métodos de síntesis peptídica convencionales líquidos, preferentemente en fase sólida bien establecidos, cuya descripción general está disponible ampliamente (véase, por ejemplo, en J.M. Stewart and J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edición, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984), en M. Bodanzsky y A. Bodanzsky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, New York (1984); y Applied Biosystems 430A Users Manual, ABI Inc., Foster City, California), o se pueden preparar en solución, mediante el método de fase líquido o mediante cualquier combinación de fase sólida, fase líquido y química de soluciones, por ejemplo, completando primero la parte correspondiente de péptido y después, si se desea y es apropiado, después de retirar cualquier grupo protector que esté presente, mediante la

introducción del resto X por reacción del ácido carbónico o sulfónico respectivo o un derivado reactivo de los mismos.

5 Otros compuestos candidatos para la inhibición de una cinasa mitótica se pueden basar en el modelo de la estructura tridimensional de estas enzimas y utilizando un diseño racional de fármacos para proporcionar compuestos candidatos con características moleculares de forma, tamaño y carga particulares. Un inhibidor candidato, por ejemplo, puede ser un "análogo funcional" de un fragmento peptídico u otro compuesto que inhiba el componente. Un análogo funcional tiene la misma actividad funcional que el péptido u otro compuesto en cuestión. Ejemplos de dichos análogos incluyen compuestos químicos que se modelan para que se parezcan a la estructura tridimensional del componente en un área que contacta con otro componente, y en particular a la disposición de los restos de aminoácido claves que este presenta.

Inhibición del ácido nucleico

15 Otra clase de inhibidores útil para el tratamiento de un cáncer con PTEN mutado o deficiente incluye inhibidores del ácido nucleico de la proteína cinasa TTK, o los complementos de la misma, que inhiben la actividad o la función mediante la regulación negativa de la producción del polipéptido activo. Esto se puede controlar utilizando métodos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante exploración utilizando una PCR en tiempo real como se describe en los ejemplos.

20 La expresión de cinasas mitóticas se puede inhibir utilizando una tecnología de ARNi o anti-sentido. El uso de estas estrategias para regular negativamente la expresión genética, está ya bien establecido en la técnica.

25 Los oligonucleótidos anti-sentido se pueden diseñar para que se hibriden a la secuencia complementaria del ácido nucleico, pre-ARNm o ARNm maduro, interfiriendo con la producción de un componente base de la ruta de reparación de la escisión de manera que se reduce su expresión o se evita completamente o sustancialmente completamente. Además de dirigirse a la secuencia codificante, las técnicas anti-sentido se pueden utilizar para dirigirse a secuencias de control de un gen, por ejemplo, en la secuencia flanqueante 5', en la que los oligonucleótidos anti-sentido pueden interferir con la expresión de las secuencias de control. La construcción de secuencia anti-sentido y su uso se describe, por ejemplo, en Peyman & Ulman, Chemical Reviews, 90:543-584, 1990 y Crooke, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:329-376, 1992.

30 Los oligonucleótidos se pueden generar *in vitro* o *ex vivo* por la administración o el ARN antisentido se puede generar *in vivo* en las células en las que se desee la regulación negativa. Por tanto, el ADN de doble cadena se puede colocar bajo el control de un promotor en una "orientación inversa" de manera que la transcripción de la cadena anti-sentido del ADN da lugar a un ARN que es complementario al ARNm normal transcrito a partir de la cadena en sentido del gen diana. Se cree que la secuencia de ARN anti-sentido complementaria se une entonces con ARNm para formar un dúplex, inhibiendo la traducción del ARNm endógeno a partir del gen diana en una proteína. Si esto es o no el modo de acción actual sigue incierto. Sin embargo, es un hecho establecido que la técnica funciona.

35 No es necesario utilizar la secuencia completa correspondiente a la secuencia codificante en orientación inversa. Por ejemplo, se pueden utilizar fragmentos de longitud suficiente. Es una materia de rutina para el experto en la técnica explorar fragmentos de distintos tamaños y de distintas partes de las secuencias codificantes o flanqueantes de un gen para optimizar el nivel de inhibición anti-sentido. Puede ser ventajoso incluir el codón ATG de inicio de metionina, o quizá uno o más nucleótidos corriente arriba del codón de inicio. Un fragmento adecuado puede tener aproximadamente 14-23 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 15, 16 o 17 nucleótidos.

50 Una alternativa al anti-sentido es utilizar una copia de todo o parte del gen diana insertado en sentido, que es la misma, orientación que el gen diana, para conseguir la reducción de la expresión del gen diana mediante co-supresión (Angell & Baulcombe, The EMBO Journal 16(12):3675-3684, 1997 y Voinnet & Baulcombe, Nature, 389: 553, 1997). Se ha descubierto que el ARN de cadena doble (dsARN) es incluso más eficaz en el silenciamiento genético que ambas cadenas en sentido o anti-sentido solas (Fire et al, Nature 391, 806-811, 1998). El silenciamiento mediado por el dsARN es específico del gen y a menudo se llama ARN de interferencia (ARNi). Los métodos relacionados con el uso del ARNi para silenciar genes en *C. elegans*, *Drosophila*, plantas, y mamíferos se conocen en la técnica (Fire, Trends Genet., 15: 358-363, 1999; Sharp, RNA interference, Genes Dev. 15: 485-490 2001; Hammond et al., Nature Rev. Genet. 2: 110-1119, 2001; Tuschl, Chem. Biochem. 2: 239-245, 2001; Hamilton et al., Science 286: 950-952, 1999; Hammond, et al., Nature 404: 293-296, 2000; Zamore et al., Cell, 101: 25-33, 2000; Bernstein, Nature, 409: 363-366, 2001; Elbashir et al, Genes Dev., 15: 188-200, 2001; WO 01/29058; WO 99/32619, y Elbashir et al, Nature, 411: 494-498, 2001).

60 El ARN de interferencia es un procedimiento de dos etapas. Primero, se escinde el dsARN en la célula para dar lugar a ARN de interferencia cortos (ARNip) de aproximadamente 21-23 nt de longitud con un fosfato en el extremo 5' y protuberancias cortas en 3' (~ 2 nt). Los ARNip se dirige a la secuencia de ARNm correspondiente específicamente para la destrucción (Zamore, Nature Structural Biology, 8, 9, 746-750, 2001).

El ARNi también se puede inducir eficazmente utilizando dúplex de ARNip sintetizados químicamente de la misma estructura con las protuberancias de los extremos 3' (Zamore et al, Cell, 101: 25-33, 2000). Se ha demostrado que los dúplex de ARNip sintético suprimen específicamente la expresión de genes endógenos y heterólogos en un amplio intervalo de líneas celulares de mamífero (Elbashir et al, Nature, 411: 494-498, 2001).

Otra posibilidad es que se utilice un ácido nucleico que produce una ribozima al transcribirse, capaz de cortar el ácido nucleico en un sitio específico y por lo tanto también es útil en la influencia sobre la expresión genética, por ejemplo, véase Kashani-Sabet & Scanlon, Cancer Gene Therapy, 2(3): 213-223, 1995 y Mercola & Cohen, Cancer Gene Therapy, 2(1): 47-59, 1995.

Se pueden emplear moléculas de ARN pequeño para regular la expresión genética. Estas incluyen la degradación dirigida de ARNm por ARN de interferencia pequeños (ARNip), silenciamiento genético post-transcripcional (PTG), represión traduccional específica de secuencia regulada en el desarrollo de ARNm con microARN (miARN) y silenciamiento genético transcripcional dirigido.

También se ha demostrado un papel de la maquinaria ARNi y ARN pequeños en el direccionamiento de complejos de heterocromatina y silenciamiento genético epigenético en loci cromosómicos específicos. El silenciamiento post-transcripcional dependiente de ARN de doble cadena (dsARN), también conocido como ARN de interferencia (ARNi), es un fenómeno en el que los complejos de dsARN pueden dirigirse a genes específicos de homología para el silenciamiento en un corto periodo de tiempo. Esto actúa como una señal para promover la degradación del ARNm con identidad de secuencia. Un ARNip de 20 nt. es generalmente lo suficientemente largo para inducir un silenciamiento específico de un gen, pero lo suficientemente corto para evitar la respuesta del huésped. La disminución de la expresión de los productos de gen dirigido puede ser extenso con una inducción del 90 % de silenciamiento por unas pocas moléculas de ARNip.

En la técnica, estas secuencias de ARN se denominan "ARN de interferencia cortos o pequeños" (ARNip) o "microARN" (miARN) dependiendo de su origen. Ambos tipos de secuencia se pueden utilizar para regular negativamente la expresión genética uniéndose a los ARN complementarios y desencadenando la eliminación del ARNm (ARNi) o deteniendo la traducción de ARN en proteínas. Los ARNip se derivan por procesamiento de ARN de doble cadena largos y cuando se encuentran en la naturaleza son normalmente de origen exógeno. Los ARN de microinterferencia (miARN) son ARN no codificantes que se codifican endógenamente, que se derivan mediante procesamiento de horquillas cortas. Tanto el ARNip como el miARN pueden inhibir la traducción de ARNm que albergan secuencias diana parcialmente complementarias sin escisión de ARN y degradan los ARNm que albergan las secuencias completamente complementarias.

Los ligandos de ARNip son normalmente de cadena doble y, con el fin de optimizar la eficacia de la regulación negativa mediada por ARN de la función de un gen diana, se prefiere que la longitud de la molécula de ARNip se escoja para asegurar el reconocimiento correcto del ARNip por el complejo RISC que media en el reconocimiento del ARNm diana por el ARNip y de manera que el ARNip sea suficientemente corto para reducir una respuesta del huésped.

Los ligandos de miARN son normalmente de cadena sencilla y tienen regiones que son parcialmente complementarias haciendo posible que los ligandos formen una horquilla. Los miARN son genes ARN que se transcriben a partir de ADN, pero no se traducen en proteínas. Una secuencia de ADN que codifica un gen miARN es más largo que el miARN. Esta secuencia de ADN incluye la secuencia del miARN y un complemento inverso aproximado. Cuando esta secuencia de ADN se transcribe en una molécula de ARN de cadena sencilla, la secuencia de miARN y su base complementaria inversa se emparejan para formar un segmento de ARN parcialmente de cadena doble. El diseño de las secuencias de microARN se expone en PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004.

Normalmente, los ligandos de ARN que pretenden imitar los efectos de ARNip o miARN tienen entre 10 y 40 ribonucleótidos (o análogos sintéticos de los mismos), más preferentemente entre 17 y 30 ribonucleótidos, más preferentemente entre 19 y 25 ribonucleótidos y más preferentemente entre 21 y 23 ribonucleótidos. En algunas realizaciones de la invención que emplean el ARNip de doble cadena, la molécula puede tener protuberancias 3' simétricas, por ejemplo, de uno o dos (ribo)nucleótidos, normalmente un UU de una protuberancia dTdT 3'. Basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, el experto puede fácilmente diseñar secuencias adecuadas de ARNip y miARN, por ejemplo, utilizando fuentes tales como el buscador de ARNip de Ambion, véase, http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html. Las secuencias de ARNip y miARN se pueden producir sintéticamente y se añaden exógenamente para producir una regulación negativa genética o se producen utilizando sistemas de expresión (por ejemplo, vectores). En una realización preferida el ARNip se sintetiza sintéticamente.

Los ARN de cadena doble más largos se pueden procesar en la célula para producir ARNip (por ejemplo, véase Myers, Nature Biotechnology, 21: 324-328, 2003). La molécula de dsARN más larga puede tener protuberancias 3' o 5', por ejemplo, de uno o dos (ribo)nucleótidos, o puede tener los extremos truncados. Las moléculas de dsARN más largas pueden tener 25 nucleótidos o mayor longitud. Preferentemente, las moléculas de dsARN más largas tienen

entre 25 y 30 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, las moléculas de dsARN más largas tienen entre 25 y 27 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, las moléculas de dsARN tienen 27 nucleótidos de longitud. Los dsARN de 30 nucleótidos de longitud o más se pueden expresar utilizando el vector pDECAP (Shinagawa et al., Genes and Dev., 17: 1340-5, 2003).

5 Otra alternativa es la expresión de una molécula de ARN horquillado corto (ARNhp) en la célula. Los ARNhp son más estables que los ARNip sintéticos. Un ARNhp consiste en repeticiones invertidas cortas separadas por una pequeña secuencia de bucle. Una repetición invertida es complementaria al gen diana. En la célula es ARNhp se procesa por DICER en un ARNip que degrada el gen de ARNm diana y suprime la expresión. En una realización preferida el ARNhp se produce endógenamente (en la célula) mediante transcripción a partir de un vector. Los ARNhp pueden producirse en una célula transfecando la célula con un vector que codifica la secuencia de ARNhp bajo el control de un promotor de ARN polimerasa III tal como el promotor H1 o 7SK humanos o un promotor de ARN polimerasa II. De manera alternativa, el ARNhp se puede sintetizar exógenamente (*in vitro*) mediante la transcripción a partir de un vector. El ARNhp se puede introducir entonces directamente en la célula. Preferentemente, la secuencia de ARNhp tiene entre 40 y 100 bases de longitud, más preferentemente entre 40 y 70 bases de longitud. El tallo de la horquilla tiene preferentemente entre 19 y 30 pares de bases de longitud. El tallo puede contener emparejamientos G-U para estabilizar la estructura de horquilla.

20 En una realización, el ARNip, el ARNds más largo o el miARN se producen endógenamente (en una célula) mediante la transcripción a partir de un vector. El vector se puede introducir en la célula en cualquiera de las maneras conocidas en la técnica. Opcionalmente, la expresión de la secuencia de ARN se puede regular utilizando un promotor específico del tejido. En una realización adicional, el ARNip, el dsARN más largo o el miARN se producen exógenamente (*in vitro*) mediante transcripción a partir de un vector.

25 De manera alternativa, las moléculas de ARNip se pueden sintetizar utilizando técnicas de síntesis en fase de solución o sólida convencionales, que se conocen en la técnica. Las uniones entre los nucleótidos pueden ser enlaces fosfodiéster o alternativas, por ejemplo, grupos de unión de fórmula P(O)S, (tioato); P(S)S, (ditioato); P(O)NR'2; P(O)R'; P(O)OR6; CO; o CONR'2 en los que R es H (o una sal) o un alquilo (1-12C) y R6 es alquilo (1-9C) está unido a nucleótidos adyacentes mediante -O- o -S-.

30 Se pueden utilizar bases de nucleótido modificadas además de las bases de origen natural, y se pueden conferir propiedades ventajosas en las moléculas de ARNip que las contienen.

35 Por ejemplo, las bases modificadas pueden aumentar la estabilidad de la molécula de ARNip, reduciendo de esta manera la cantidad necesaria para el silenciamiento. La provisión de bases modificadas también puede proporcionar moléculas de ARNip, que sean más, o menos, estables que el ARNip sin modificar.

40 La expresión 'base de nucleótido modificada' engloba nucleótidos con una base y/o azúcar modificadas covalentemente. Por ejemplo, los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos que tienen azúcares, que están unidas covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 3' y distintos de un grupo fosfato en la posición 5'. Por lo tanto, los nucleótidos modificados pueden incluir también azúcares sustituidos en 2' tales como 2'-O-metil-; 2'-O-alquil-; 2'-O-alil-; 2'-S-alquil-; 2'-S-alil-; 2'-fluoro-; 2'-halo o 2'-azido-ribosa, azúcares α -anoméricos análogos de azúcar carboxílico; azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosa, o líxosa, azúcares piranosas, azúcares piranosas y pseudoheptulosas.

45 Los nucleótidos modificados se conocen en la técnica e incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas y pirimidinas aciladas, y otros heterociclos. Estas clases de pirimidinas y purinas se conocen en la técnica e incluyen pseudoisocitosina, N4,N4-etanocitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5 fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometil uracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopentil-adenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometil uracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, D-manosilqueosina, 5-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopentiladenina, metiléster del ácido oxiacético-5-uracilo, pseudouracilo, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido oxiacético-5-N-uracilo, ácido oxiacético-5-uracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-propiluracilo, 5-propilcitosina, 5-etiluracilo, 5-etilcitosina, 5-butiluracilo, 5-pentiluracilo, 5-pentilcitosina, y 2,6-diaminopurina, metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilcitosina.

Métodos de exploración

60 En algunos aspectos, la presente invención se refiere a los métodos de exploración de compuestos candidatos para determinar si es probable que uno o más agentes candidatos son útiles para el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente. Como se describe en el presente documento, hay tres estrategias generales preferidas que se pueden utilizar para estos métodos de exploración, sean solas o en cualquier combinación u orden.

65 En los métodos de exploración, puede ser ventajoso utilizar una línea celular con PTEN mutante para ensayar la eficacia de un candidato a inhibidor de la proteína cinasa TTK. Está disponible una lista completa de líneas celulares

con PTEN mutante para recuperarse a partir de la base de datos COSMIC:

[http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=mutations
&ln=PTEN&start=1&end=404&coords=AA:AA&page=1\)](http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=mutations&ln=PTEN&start=1&end=404&coords=AA:AA&page=1)

5 En una primera estrategia, un método de exploración puede implicar el uso de líneas celulares para determinar si un agente candidato es sintéticamente letal en una primera línea celular con el PTEN mutado o deficiente. Este método utiliza también preferentemente una segunda línea celular con el PTEN competente como control y se seleccionan agentes candidatos que son sintéticamente letales en la primera línea celular y que no produce ninguna cantidad de muerte celular sustancial en la segunda línea celular y/o células normales. Por lo tanto, en esta realización de la invención se explota la letalidad sintética en células cancerosas. Dos mutaciones son letales sintéticamente si las células de cualquiera de las mutaciones únicas son viables, pero las células con ambas mutaciones son inviables. La identificación de las combinaciones letales sintéticas permite una estrategia distinta para identificar dianas terapéuticas que permiten la destrucción selectiva de las células tumorales. Preferentemente, el método se lleva a cabo utilizando líneas celulares de cáncer, por ejemplo, líneas celulares cancerosas de mamífero o humanas, y más específicamente líneas celulares cancerosas con el PTEN mutante o deficiente.

20 Una manera preferida de identificar interacciones letales sintéticas implica el uso de exploraciones de ARNi. La letalidad sintética describe el escenario en el que dos genes normalmente no esenciales se convierten en esenciales cuando ambos se pierden o inhiben. El direccionamiento de un gen que es sintéticamente letal con una mutación cancerosa específica debería destruir selectivamente células tumorales mientras que respeta las células normales. Una de las mayores ventajas de esta estrategia es dirigirse a las células de cáncer que contienen mutaciones de pérdida de función, es decir, las mutaciones en genes supresores del tumor. Previamente, era difícil visionar estrategias terapéuticas para dirigirse a estas mutaciones porque recopilarla función supresora tumoral es técnicamente difícil. La mayoría de los agentes farmacéuticos más bien inhiben que activan la función proteica y por lo tanto no se pueden utilizar para dirigirse a alteraciones con pérdida de función en tumores. La identificación de relaciones letales sintéticas con genes supresores tumorales podría permitir que las células que contienen las mutaciones supresoras tumorales se destruyan selectivamente.

30 El uso de letalidad sintética para dirigirse a mutaciones específicas de cáncer se ha demostrado mediante la destrucción selectiva de células cancerosas con el PTEN mutado o deficiente utilizando inhibidores de cinasa mitótica. Estos inhibidores demuestran una profunda selectividad, destruyen las células con mutaciones o deficiencia de PTEN, mientras que las células normales no se afectan. Sin embargo, con la llegada de las exploraciones de ARNi de alto rendimiento ahora es posible, en principio, llevar a cabo la identificación de genes letales sintéticos a gran escala en células de mamífero, como se hace rutinariamente en levaduras. La detección en la exploración de mutantes que tienen defectos en el punto de control del ciclo celular o los mecanismos de reparación de ADN en levaduras ha dado lugar a genes letales sintéticamente e inhibidores de molécula pequeña. Utilizando líneas celulares isogénicas emparejadas de mamífero que se diferencian en una única diana genética, se puede utilizar el ARNi para identificar fármacos diana que cuando se inhiben darán como resultado la muerte selectiva de las células tumorales.

45 Las exploraciones químicas se habían llevado a cabo previamente en líneas celulares cancerosas isogénicas en cuanto a interacciones letales sintéticas. sin embargo, dichas estrategias tienen la desventaja significativa de tener que identificar las dianas celulares de una molécula pequeña activa. Esto se puede conseguir ilustrando la afinidad de una molécula pequeña por una proteína particular, pero esto consume tiempo y tiene la limitación de que se unirán a proteínas irrelevantes además de a la diana. Una variación del tema de letalidad sintética es para utilizar compuestos que inhiban una diana específica del cáncer y entonces se exploran las bibliotecas de ARNi para identificar dianas que selectivamente destruyan las células tratadas con este compuesto.

50 La presente invención también incluye métodos de exploración que emplean cinasas mitóticas como dianas proteicas para explorar compuestos candidatos para encontrar inhibidores de cinasa mitótica. En consecuencia, los métodos de exploración se pueden llevar a cabo para identificar agentes candidatos que sean capaces de inhibir la TTK proteínas cinasa para su uso posterior en el desarrollo como agentes para el tratamiento del cáncer con PTEN mutado o deficiente. Convenientemente, esto se puede hacer en un tampón de ensayo para ayudar a que interactúen los componentes del ensayo, y en un formato de pocillos múltiples para ensayar una pluralidad de agentes candidatos.

60 La actividad de una cinasa mitótica se puede determinar entonces en presencia y ausencia de uno o más compuestos candidatos para determinar si un determinado candidato es un inhibidor de una cinasa mitótica.

65 A modo de ejemplo, el agente candidato puede ser un inhibidor conocido de una de las proteínas diana desveladas en el presente documento, un anticuerpo, un péptido, una molécula de ácido nucleico o un compuesto orgánico o inorgánico, por ejemplo, de peso molecular menor de 100 Da. En algunos casos se prefiere el uso de agentes candidatos que son compuestos. Sin embargo, para algunos tipos de agente candidato, la tecnología de biblioteca combinatoria proporciona una vía eficaz de ensayo de un número potencialmente enorme de diferentes sustancias en cuanto a su capacidad para modular la actividad de una proteína diana. Dichas bibliotecas y su uso se conocen

en la técnica. La presente invención también prevé la exploración de agentes candidatos conocidos para el tratamiento de otras afecciones, y especialmente otras formas de cáncer. Esto tiene la ventaja de que el perfil del paciente o enfermedad de agentes terapéuticos conocidos se puede expandir o modificar utilizando las técnicas de exploración desveladas en el presente documento, o para los agentes en desarrollos, los perfiles de paciente o enfermedad establecidos que son relevantes para el tratamiento del cáncer con el PTEN mutado o deficiente.

A continuación de la identificación de un agente candidato para su investigación adicional, el agente en cuestión se puede ensayar para determinar si no es letal para las células normales o de otra manera si es adecuado para su uso terapéutico. A continuación de estos estudios, el agente se puede fabricar y/o utilizar en la preparación de un medicamento, una composición farmacéutica o forma de dosificación.

El desarrollo de agentes líderes o compuestos a partir de un éxito inicial en los ensayos de exploración puede ser deseable cuando el agente en cuestión es difícil o caro de sintetizar o cuando es inadecuado para un método particular de administración, por ejemplo, los péptidos son agentes activos inadecuados para composiciones orales ya que tienden a degradarse rápidamente por las proteasas en el canal alimentario. Se utiliza en general el diseño, la síntesis y ensayo de miméticos para evitar aleatoriamente la exploración de un gran número de moléculas con una propiedad de direccionamiento.

Hay varias etapas que se aplican comúnmente en el diseño de un mimético a partir de un compuesto que tiene una determinada propiedad de direccionamiento. En primer lugar, se determinan las partes del compuesto en particular que son críticas y/o importantes en la determinación de la propiedad de direccionamiento. En el caso de un péptido, esto se puede hacer variando sistemáticamente los restos de aminoácidos del péptido, por ejemplo, sustituyendo cada resto uno a uno. Estas partes o restos que constituyen la región activa del compuesto se conocen como su "farmacóforo".

Una vez que se ha encontrado el farmacóforo, se modela su estructura de acuerdo con sus propiedades físicas, por ejemplo, estereoquímica, enlazamiento, tamaño y/o carga, utilizando datos a partir de un intervalo de fuentes, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, datos de difracción por rayos X y NMR. Se pueden utilizar el análisis computacional, mapeo de similitud (con modelos de carga y/o volumen de un farmacóforo, más que la unión entre los átomos) y otras técnicas en este proceso de modelado. En una variante de esta estrategia, se modela la estructura tridimensional del ligando y su pareja de unión. Esto puede ser especialmente útil cuando el ligando y/o la pareja de unión cambia la conformación de la unión, permitiendo que el modelo tenga en cuenta esto en el diseño del mimético.

Se selecciona entonces una molécula matriz en la que se pueden injertar los grupos químicos que imitan al farmacóforo. La molécula matriz y los grupos químicos injertados se pueden seleccionar convenientemente de manera que el mimético sea fácil de sintetizar, sea probablemente farmacológicamente aceptable, y no se degrade *in vivo*, mientras que mantenga la actividad biológica del compuesto líder. Los miméticos que se encuentran en esta estrategia se pueden explorar entonces para ver si tienen la propiedad de direccionamiento, o en que extensión la presentan. Se puede llevar a cabo entonces una optimización o modificación adicional para llegar a uno o más miméticos finales para el ensayo *in vivo* o clínico.

Tratamiento del cáncer

La presente invención proporciona métodos y usos métodos para el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente. Un cáncer se puede identificar como con el PTEN mutado o deficiente ensayando una muestra de células cancerosas de un individuo, por ejemplo, para determinar si la proteína PTEN contiene una o más mutaciones o para determinar la expresión del gen PTEN para evaluar si la expresión de la proteína está ausente o en un nivel reducido en comparación con el normal. Se sabe que la inactivación genética de PTEN se produce en el glioblastoma, cáncer endometrial y cáncer de próstata y se encuentra una expresión reducida en muchos otros tipos tumorales que incluyen el cáncer de pulmón y de mama. Ejemplos de cánceres conocidos con el PTEN mutado o deficiente que son tratables de acuerdo con la presente invención incluyen cánceres que afectan los ganglios autónomos, tracto biliar, hueso, mama, SNC, cuello uterino, endometrio, ojo, tejido hematopoyético y linfóide, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, meninges, esófago, ovario, páncreas, próstata, glándula salivar, piel, tejidos blandos, estómago, testículos, tiroides, tracto aerodigestivo superior, tracto urinario, o vulva. El cáncer asociado a mutaciones del PTEN se produce a lo largo de la secuencia codificante completa del gen e incluye tanto las mutaciones de truncado prematuras y las sustituciones de aminoácidos únicos tanto en los dominios catalíticos y no catalíticos de la proteína. La frecuencia de mutaciones monoalélicas en PTEN se han estimado en el 50 %-80 % en tumores esporádicos (incluyendo carcinoma endometrial, glioblastoma, y cáncer de próstata) y en un 30 %-50 % en tumores de mama, colon y pulmón. La pérdida completa del PTEN se observa en frecuencias más altas en el cáncer endometrial y glioblastoma y se asocia en general con cánceres avanzados y metástasis. Las mutaciones de PTEN comunes asociadas con tumores incluyen c.388C>G, c.697C>T, c.388C>T, c.800delA, c.968delA, c.517C>T, c.968_969insA, c.518G>A, c.955_958delACTT, c.1003C>T, c.950_953delTACT.

La muestra puede ser de células normales del individuo en el que el individuo tiene una mutación en el gen PTEN o la muestra puede ser de células cancerosas, por ejemplo, cuando las células que forman el tumor contienen una o

más mutaciones PTEN. La actividad se puede determinar con respecto a un control, por ejemplo, en el caso de defectos en las células cancerosas, con respecto a las células no cancerosas, preferentemente del mismo tejido.

5 La actividad del PTEN se puede determinar utilizando técnicas bien conocidas en la técnica tales como análisis de transferencia de Western, inmunohistología, anomalías cromosómicas, ensayos de unión enzimático o de ADN y ensayos basados en plásmidos.

10 La determinación de la expresión del gen PTEN puede implicar la determinación de la presencia o cantidad de ARNm de PTEN en una muestra. Los métodos para hacerlo se conocen bien por los expertos e. A modo de ejemplo, incluyen la determinación de la presencia de ARNm de PTEN (i) utilizando una sonda marcada que es capaz de hibridarse con el ácido nucleico de PTEN; y/o (ii) utilizar una PCR que implica uno o más cebadores basados en una secuencia de ácido nucleico de PTEN para determinar si la transcripción de PTEN está presente en una muestra. La sonda también se puede inmovilizar como una secuencia incluida en una micromatriz.

15 Preferentemente, la detección del ARNm de PTEN se lleva a cabo mediante la extracción del ARN de una muestra del tumor y midiendo la expresión de PTEN específicamente utilizando una RT-PCR en tiempo real cuantitativa. De manera alternativa o adicionalmente, la expresión de PTEN se puede evaluar utilizando el ARN extraído de una muestra tumoral utilizando el análisis de micromatrices, que mide los niveles de ARNm para un grupo de genes utilizando una pluralidad de sondas inmovilizadas en un sustrato para formar una matriz.

20 De manera alternativa o adicionalmente, en la presente invención se puede llevar a cabo la determinación de si un paciente tiene un cáncer con PTEN mutado o deficiente mediante el análisis de expresión proteica de PTEN, por ejemplo, para examinar si se expresan niveles reducidos de proteína PTEN o si la proteína PTEN contiene una o más mutaciones.

25 Preferentemente, la presencia o cantidad de la proteína PTEN se puede determinar utilizando un agente de unión capaz de unirse específicamente a la proteína PTEN, o fragmentos de la misma. Un tipo preferido de agente de unión a la proteína PTEN es un anticuerpo capaz de unirse a la PTEN o un fragmento de la misma. El anticuerpo se puede marcar para facilitar que sea detectado o capaz de detección después de la reacción con una o más especies adicionales, por ejemplo, utilizando un segundo anticuerpo que está marcado o capaz de producir un resultado detectable, por ejemplo, en un ensayo tipo ELISA. Como alternativa, se puede utilizar un agente de unión marcado en una transferencia de Western para detectar la proteína PTEN.

30 De manera alternativa o adicionalmente, el método para la determinación de la presencia de la proteína PTEN se puede llevar a cabo sobre muestras tumorales, por ejemplo, utilizando análisis inmunohistoquímicos (IHC). Los análisis IHC se pueden llevar a cabo utilizando muestras fijadas en parafina o muestras de tejido congelado, y generalmente implican la tinción de las muestras para resaltar la presencia y localización de la proteína PTEN.

40 *Composiciones farmacéuticas*

Los agentes activos desvelados en el presente documento para el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente se puede administrar solo, pero generalmente es preferible proporcionarlos en composiciones farmacéuticas, que comprenden adicionalmente uno o más vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, estabilizantes, conservantes, lubricantes, u otros materiales farmacéuticamente aceptables conocidos por los expertos en la técnica y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos. Ejemplos de los componentes de las composiciones farmacéuticas se proporcionan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

50 Ejemplos de agentes terapéuticos de molécula pequeña útiles para el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente incluyen: BEZ235, Olaparib y GDC0941.

55 Estos compuestos o derivados de ellos se pueden utilizar en la presente invención para el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente. Como se utiliza en el presente documento "derivados" de los agentes terapéuticos incluyen sales, complejos de coordinación, ésteres tales como ésteres hidrolizables *in vivo*, ácidos o bases libres, hidratos, profármacos o lípidos, parejas de acoplamiento.

60 Las sales de los compuestos de la invención son preferentemente bien tolerados fisiológicamente y no tóxicos. Se conocen muchos ejemplos de sales por los expertos en la técnica. Los compuestos que tienen grupos ácidos, tales como los fosfatos o sulfatos, pueden formar sales con metales alcalinos o alcalinotérreos tales como el Na, K, Mg y Ca, y con aminos orgánicas tales como la trietilamina y Tris (2-hidroxi)etilamina. Se pueden formar sales entre compuestos con grupos básicos, por ejemplo, aminos, con ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico, o ácidos orgánicos tales como el ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido fumárico, o ácido tartárico. Los compuestos que tienen grupos tanto ácidos como básicos pueden formar sales internas.

65 Se pueden formar ésteres entre grupos hidroxilo o de ácido carboxílico presentes en el compuesto y una pareja de

reacción apropiada de ácido o alcohol carboxílico, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica.

Los derivados como los profármacos de los compuestos se convierten *in vivo* o *in vitro* en uno de los compuestos parentales, Normalmente, al menos una de las actividades del compuesto se reducirá en el compuesto en forma de profármaco, y se puede activar por conversión del profármaco para liberar el compuesto o un metabolito del mismo.

Otros derivados incluyen las parejas de acoplamiento del compuesto en las que los compuestos se unen a una pareja de acoplamiento, por ejemplo, estando acoplada químicamente al compuesto o asociada físicamente con el mismo. Ejemplos de parejas de acoplamiento incluye un marcador o molécula indicadora, un sustrato de soporte, un vehículo o molécula de transporte, un efector, un fármaco, un anticuerpo o un inhibidor. Las parejas de acoplamiento se pueden unir covalentemente a compuestos de la invención mediante un grupo funcional adecuado del compuesto tale como un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo o grupo amino. Otros derivados incluyen la formulación de los compuestos con liposomas.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en el presente documento incluye los compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, en el alcance del sano juicio médico, adecuado para su uso en contacto con los tejidos del sujeto (por ejemplo, el ser humano) sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas, u otro problema o complicación, proporcional con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. También debe ser "aceptable" en el sentido de que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Los agentes activos desvelados en el presente documento para el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente de acuerdo con la presente invención son preferentemente para la administración a un individuo de una "cantidad profilácticamente eficaz" o de una "cantidad terapéuticamente eficaz" (como sea el caso, aunque la profilaxis se puede considerar una terapia), siendo esta suficiente para demostrar un beneficio en el individuo. La cantidad actual administrada, y la tasa y curso en el tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se trate. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones de dosificación, etc., es la responsabilidad de los médicos generales y otros doctores médicos, y normalmente, tiene en cuenta el trastorno que se va a tratar, la afección del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins. Una composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, se simultáneamente o secuencialmente, dependiendo de la afección que se va a tratar.

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de poner el compuesto activo en asociación con un vehículo, que puede estar constituido por uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el compuesto activo con vehículos líquidos o vehículos solidos divididos finamente o ambos, y entonces si es necesario dando forma al producto.

Los agentes desvelados en el presente documento para el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente se pueden administrar a un sujeto mediante una vía de administración conveniente, sea sistemáticamente/periféricamente o en el sitio de acción deseada incluyendo pero sin limitarse a, oral (por ejemplo, mediante ingestión); tópica (incluyendo, por ejemplo, transdérmica, intranasal, ocular, bucal y sublingual); pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación o terapia de insuflación utilizando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o la nariz); rectal; vaginal; parenteral, por ejemplo, mediante inyección, incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intramedular, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea, e intraesternal; mediante el implante de un depósito, por ejemplo, subcutáneo o intramuscular.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral (por ejemplo, mediante ingestión) se pueden presentar como unidades por separado tales como cápsulas, papelillos o comprimidos, conteniendo cada una, una cantidad predeterminada del compuesto activo; como un polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite; como un bolo; como un electuario; o como una pasta.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, que incluyen, cutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa, o intradérmica), incluyen soluciones para inyección acuosas o no acuosas, isotónicas, libres de pirógenos, estériles que pueden contener anti-oxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes, y liposomas u otros sistemas de micropartículas que se diseñan para dirigir el compuesto a componentes de la sangre o uno o más órganos. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para su uso en dichas formulaciones incluyen la inyección de cloruro sódico, solución de Ringer, o inyección de Ringer Lactato. Normalmente, la concentración del compuesto activo en la solución es desde aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 mg/ml, por ejemplo,

desde aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 mg/ml. Las formulaciones se pueden presentar en envases sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en condiciones de secado por congelación (liofilizados) que solamente necesitan la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Las formulaciones pueden estar en forma de liposomas u otros sistemas de micropartículas que se diseñan para dirigir el compuesto activo a los componentes de la sangre o uno o más órganos.

Las composiciones que comprenden los agentes desvelados en el presente documento para el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento en combinación con regímenes quimioterapéuticos convencionales o en conjunción con radioterapia. Ejemplos de otros agentes quimioterápicos incluyen Amsacrina (Amsidina), Bleomicina, Busulfan, Capecitabina (Xeloda), Carboplatino, Carmustina (BCNU), Clorambucilo (Leukeran), Cisplatino, Cladribina (Leustat), Clofarabina (Evoltra), Crisantaspasa (Erwinasa), Ciclofosfamida, Citarabina (ARA-C), Dacarbazina (DTIC), Dactinomicina (Actinomicina D), Daunorrubicina, Docetaxel (Taxotere), Doxorubicina, Epirubicina, Etopósido (Vepesid, VP-16), Fludarabina (Fludara), Fluorouracilo (5-FU), Gemcitabina (Gemzar), Hidroxiurea (Hidroxicarbamida, Hidrea), Idarrubicina (Zavedos), Ifosfamida (Mitoxano), Irinotecan (CPT-11, Campto), Leucovorin (ácido folínico), doxorubicina liposómica (Caelix, Miocet), daunorrubicina liposómica (DaunoXome®) Lomustina, Melfalan, Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Mitomicina, Mitoxantrona, Oxaliplatino (Eloxatin), Paclitaxel (Taxol), Pemetrexed (Alimta), Pentostatina (Nipent), Procarbazona, Raltitrexed (Tomudex®), Streptozocin (Zanosar®), Tegafururacilo (Uftoral), Temozolomida (Temodal), Teniposida (Vumon), Tiotepa, Tioguanina (6-TG) (Lanvis), Topotecan (Hicamtin), Treosulfan, Vinblastina (Velbe), Vincristina (Oncovin), Vindesina (Eldisina) y Vinorelbina (Navelbina).

La administración *in vivo* se puede efectuar en una dosis, continuamente o intermitentemente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos apropiados) durante el curso de tratamiento. Los métodos para determinar el medio más eficaz y la dosificación de administración son bien conocidos para los expertos en la técnica y variarán con la formulación utilizada para la terapia, el fin de la terapia, la célula diana que se va a tratar, y el sujeto que se va a tratar. Se pueden llevar a cabo administraciones únicas y múltiples con el nivel de dosis seleccionado el médico del tratamiento.

En general, una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 250 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto por día. Cuando el compuesto activo es una sal, un éster, profármaco, o similares, la cantidad administrada se calcula basándose en el compuesto parental, y entonces el peso actual que se va a utilizar se aumenta proporcionalmente.

Ejemplos experimentales

Métodos

Líneas celulares, compuestos y ARNip

Todas las líneas celulares se obtuvieron en la ATCC (USA) y se mantuvieron de acuerdo con las instrucciones del suministrador. Las líneas celulares se cultivaron y transfectaron con los ARNip SMARTpool utilizando los reactivos de transfección Dharmafect 3 (DF3), Dharmafect 4 (DF4), (Dharmacon), Oligofectamina, Lipofectamina 2000 o RNAiMAX (Invitrogen). Se obtuvo la biblioteca de ARNip (genes de supuesta proteína cinasa humana y 714 conocida que se dirige a siARRAY) en nueve placas de 96 pocillos en Dharmacon (USA). Cada pocillo de esta biblioteca contenía un SMARTpool de cuatro especies de ARNip distintas que se dirigen a diferentes secuencias de la transcripción diana. Cada placa se suplementó con CONTROLip (diez pocillos, Dharmacon (USA)).

Anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra los siguientes según las instrucciones de los fabricantes: ACTINA y C-MYC (Santa Cruz Biotech), TTK, ER, PR, ERBB2, CYCLIN D1, TFF1, FOXO1, C-JUN, y extremo C del PTEN (Cell Signalling, Danvers, USA). Todos los anticuerpos que se utilizaron para el análisis de transferencia de Western estaban conjugados con HRP.

Exploración del ARN de interferencia

Los inventores transfectaron las células con la biblioteca SMARTpool, en el que cada pocillo de la placa de 96 pocillos contenía un agrupamiento de cuatro ARNip diferentes (un SMARTpool) que se dirigen a un gen. Después de cinco doblajes de población, se estimó la viabilidad de cada pocillo mediante el uso de un ensayo luminiscente altamente sensible que mide los niveles de ATP (Cell Titre Glo, Promega). Para identificar los efectos de la pérdida de viabilidad/fallo para proliferar en cada línea celular, se transformaron las lecturas de luminiscencia de cada pocillo logarítmicamente y entonces se centraron por la mediana de la placa, para tener en cuenta la variación común de placa a placa en exploraciones de alto rendimiento. Los efectos de la posición del pocillo se identificaron y eliminaron y la calidad de los datos de cada placa se estimaron mediante el cálculo de los factores Z' (24)

basándose en los controles positivo (ARNip que se dirige a PLK1) y negativo (ARNip sin dirigir) en cada placa. El rango dinámico de cada exploración se determinó calculando los valores Z prima (24); los inventores utilizaron un umbral de Z prima > 0,3 para definir exploraciones aceptables, basándose en exploraciones previas en las que Z prima > 0,3 son predictivas de datos reproducibles (25, 26).

5 Para permitir que se comparen los datos entre las diferentes líneas celulares, los datos centrados por placa de cada exploración se convencionalizaron por el uso de una estadística de puntuación Z, donde Z = 0 representa ningún efecto sobre la viabilidad y las valoraciones de Z negativas representan pérdida de viabilidad. Aquí, las valoraciones Z se calcularon utilizando la Desviación Absoluta de la Mediana (MAD) de todos los efectos en cada línea celular (5).
 10 En cada exploración los datos de la valoración Z se aproximaban a la distribución normal permitiendo la comparación de los efectos de los ARNip individuales a lo largo de las líneas celulares. Las exploraciones de ARNip se llevaron a cabo por triplicado y la comparación de los datos de puntuaciones Z de las exploraciones replicadas de cada línea celular demostraban que el procedimiento de exploración era altamente robusto, como se demostraba por la estrategia 1 de los valores r2 de Spearman en todas las comparaciones. Se confirmó la calidad de las mediciones
 15 de cada exploración. Los valores de luminiscencia en bruto y los datos procesados se depositaron ahora en la base de datos genómica funcional de cáncer de mama ROCK (23) (rock.icr.ac.uk) como un recurso de la comunidad. Este método riguroso de control de calidad reducía el panel de línea célula de los inventores a 20 líneas celulares con perfiles de viabilidad robusta. Se crearon mapas calientes de las valoraciones Z que separaban diferentes fenotipos como se define por un ensayo de diferentes de permutación para mostrar los genes significativos colocados en filas
 20 de acuerdo con su diferencia de mediana y ordenadas en columnas por el fenotipo.

Transferencias de Western

25 Los lisados proteicos se prepararon utilizando tampón de lisis RIPA (50 nM Tris pH 8,0, 150 mM de NaCl, 0,1 % de SDS, 0,1 % de DOC, 1 % de Triton X-100, 50 mM NaF, 1 mM de Na3VO4 e inhibidores de proteasa). Se cargaron 100 mg de lisado celular total en geles 4-12 % Bis-Tris prefabricados (Invitrogen), con un marcador de peso molecular de arco iris de intervalo completo (GE Healthcare, UK) como una referencia de tamaño y se resuelve por electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad, USA), se bloqueó y se hibridó con el anticuerpo primario diluido 1 en 1000 en un 5 % de leche durante una noche a 4 °C. Los
 30 anticuerpos secundarios se diluyeron 1 en 5000 en un 5 % de leche y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Las bandas proteicas se visualizaron utilizando ECL (GE Healthcare, UK) y película MR o XAR (Kodak).

Validación de silenciamiento genético por ARNip

35 La validación del silenciamiento genético por el ARNi se determinó por transferencia de Western y por ensayos de viabilidad de los efectos de silenciamiento con oligos individuales. Las células se transfectaron con oligos ERBB2, ESR1, PIK3CA o TTK siGenome individuales (Dharmacon). Los lisados proteicos se recolectaron 48 horas después de la transfección para los análisis de transferencia de Western. La viabilidad celular se midió utilizando CellTiter Glo (Promega, USA) después de 5 doblajes de la población.

Ensayos de supervivencia

45 Para la medición de la sensibilidad al tratamiento inhibitor de la TTK, se colocaron en placas de 96 pocillos y se expusieron al fármaco en las concentraciones indicadas. Las células se dosificaron a las 24 y 96 horas. Después de 7 días, se midió la viabilidad celular utilizando el Ensayo de Viabilidad Celular CellTiter Glo luminiscente (Promega, USA). Se calcularon las fracciones de supervivencia y las curvas de sensibilidad al fármaco se dibujaron como se había descrito anteriormente (27).

Distribución de metafase

50 Después de 24 horas de tratamiento con 2 uM de células AZ3146, HCT116, PTEN ts o nulas en PTEN con colcemida (10 ng/ml, Sigma) y MG132 (20 uM, Sigma) durante 1 hora. Las células se lisaron entonces en solución hipotónica (0,03 M de Citrato sódico) durante 20 minutos a 37 °C y se fijó en metanol/ácido acético (3:1). Se aplicaron dos o tres gotas de células suspendidas en portaobjetos de cristal y se tiñeron los cromosomas con DAPI.

FISH del PTEN

60 Los aglomerados celulares de CA151 y Hec-1b se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con una solución de metanol/ácido acético (3:1) en portaobjetos. Se hibridó una sonda de Color Dual LSI PTEN (10q23, rojo/naranja)/cromosoma de 10 centrómeros (CEP 10, verde) (Abbott Molecular, IL, US) con los portaobjetos representativos de líneas celulares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se contaron las señales en 100 núcleos no solapados utilizando el microscopio confocal TCS SP2 de Leica (Leica, Milton Keynes, UK).

Perfil de transcripciones

65 Se extrajo el ARN de las líneas celulares con Trizol y extracción con fenol/cloroformo seguido por precipitación con

isopropanol. Para cada línea celular, se llevaron a cabo extracciones y perfiles por triplicado. Se produjo ARNc marcado por biotina por medio de un kit de amplificación lineal (IL1791; Ambion, Austin, TX, <http://www.ambion.com>) utilizando 250 ng de ARN total de calidad comprobada como entrada. Se llevaron a cabo las hibridaciones en chip, lavado, tinción con Cy3-estreptavidina (Amersham Biosciences), y exploración en una plataforma BeadStation 500 Illumina (San Diego, <http://www.illumina.com>) utilizando reactivos y siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante como se había descrito anteriormente (28). Las muestras de ARNc se hibridaron en BeadChips v2 human-6 de Illumina, cubriendo aproximadamente 47.000 RefSeq de transcripciones. La distribución aleatoria de grandes poblaciones de perlas recubiertas de oligonucleótidos a lo largo de las posiciones disponibles en el chip v2 human-6 que hace posible, de media, 30 mediciones de intensidad por RefSeq, dando lugar a evaluaciones cuantitativas de expresión genética. El análisis de todos los datos de expresión básicos se llevó a cabo utilizando el software BeadStudio 3.1 del fabricante. Los perfiles de expresión Illumina se llevaron a cabo por triplicado, los datos en bruto se transformaron entonces por estabilización de la varianza y se normalizó una robusta columna utilizando el paquete *lumi* del software Bioconductor. Los valores de expresión de cada muestra se escalaron a la median y se estableció el valor de expresión media en los tres replicados. Los genes con una diferencia significativa en la expresión entre las líneas celulares se identificaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Método de análisis de matriz CHG (aCGH)

Se extrajo el ADN genómico de las líneas celulares utilizando el Mini Kit de sangre ADN QIAamp (51104, Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis de CGH basado en micromatrices se llevó a cabo en una plataforma de matriz en mosaico de 32K BAC casera como se había descrito anteriormente (29). Para las correlaciones de número de copias, se utilizaron las relaciones de segmentación binaria circular (CBS) de la BAC que contenían el gen de interés para las correlaciones del número de copias, y el número de copia se asignó como se había descrito anteriormente (29). En resumen, los valores de la relación \log_2 AWS suavizados $< -0,12$ se categorizaban como pérdidas, las $> 0,12$ como ganancias, y entre estas como sin cambios. Las amplificaciones se definieron como valores de la relación \log_2 suavizados $> 0,4$ (29). El procesamiento de datos y el análisis se llevaron a cabo en R 2.9.0 (<http://www.r-project.org/>) y BioConductor 1.5 (<http://www.bioconductor.org/>), haciendo un uso extenso de versiones modificadas de los paquetes aCGH, mmatriz y aws en particular.

Correlación de expresión genética y datos de aCGH

Se compararon aCGH y expresión genética mediante correlación directa de Pearson de los valores de intensidad \log de la expresión genética con los valores de la relación \log suavizada para cada sonda en los datos de expresión genética. La correlación de los valores de p se ajustó por ensayo de comparación múltiple utilizando el método de la Tasa de Descubrimiento Falso (FDR) local de Benjamini y Hochberg (30) como se había descrito anteriormente (29). Se llevaron a cabo los ensayos U de Mann Whitney para cada gen para comparar los valores de expresión genética en grupos definidos que se asignan como amplificados o no, perdidos o no, y eliminados o no utilizando llamadas aCGH con umbrales. Los valores de p del ensayo de Wilcoxon se corrigieron por el ensayo de comparación múltiple con regiones alteradas contiguamente. Para cada gen, en los casos en los que los genes estaban amplificados, con ganancia, pérdida o eliminados se registraron junto con las veces de cambio entre las muestras que albergan un cambio en el número de copias y las que no. El recuento total de ganancias, pérdidas, amplificaciones y eliminaciones también se registró.

Correlación de la valoración Z de ARNip con la expresión genética y los datos aCGH

La correlación entre la valoración Z del ARNip y la expresión genética normalizada se examinó en los genes en el que el ARNip producía una pérdida de viabilidad significativa ($Z < -2$). La valoración Z se comparó con la expresión genética normalizada utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Se tomó un gen como que estaba correlacionado significativamente si el coeficiente de correlación de Pearson era significativamente diferente a la hipótesis nula, la correlación era inversa, y la variación de la expresión genética entre las líneas celulares eran significativamente diferentes según se evaluaba por ANOVA de una vía.

Para la cobertura aCGH, las valoraciones Z para los 714 genes comunes de la expresión genética y la biblioteca de cinasas se correlacionaron directamente utilizando la correlación de Pearson y los valores de p se ajustaron por el ensayo de comparación múltiple utilizando el FDR (28). Los valores de expresión genética se compararon posteriormente en las líneas celulares que presentaban mayores valores de Z para cada gen y las que no. También se calcularon las veces de cambio entre estos grupos para cada gen. Se utilizaron los cambios de número de copias del a matriz CGH para cada gen para dividir las líneas celulares en las que albergaban amplificaciones, ganancias, pérdidas o eliminaciones, de las que no y se llevaron a cabo los ensayos U de Man Whitney para comparar la expresión genética entre estos grupos para cada gen. También se calculó el número de casos que albergaban amplificaciones, ganancias, pérdidas o eliminaciones también respondían con máximas valoraciones Z en la misma línea celular.

Métodos de agrupamiento

Se llevó a cabo el análisis supervisado calculando la diferencia absoluta en las medianas de los dos grupos, seguido por la estimación de un valor p permutando los marcadores para crear una distribución de las diferencias medianas en contra para comparar los efectos actuales. Los inventores utilizaron un punto de corte de significancia para $p=0,05$ sin correcciones por comparaciones múltiples. La expresión genética combinada, las valoraciones Z y las matrices aCGH se sometieron a agrupamiento jerárquico utilizando una medida de distancia de la correlación de Pearson y el algoritmo de agrupamiento de Wards. Se dibujaron mapas calientes equivalentes que agrupaban las muestras y los genes en el solapamiento combinado utilizando las valoraciones Z correspondientes. Los mapas calientes de la expresión genética y los cambios del número de copias se presentaron entonces bajo los mismos dendrogramas mediante agrupamientos por valoración Z. La estabilidad del agrupamiento se estableció por pvclust dando un valor de p aproximadamente sin tendencia (AU) mayor de 0,9. Todos los análisis se llevaron a cabo en R 2.9.0 utilizando secuencias caseras.

Verificación de la línea celular

Se utilizó el STR (repetición corta en tándem) para el perfil para verificar la autenticidad del panel de las líneas celulares. Los inventores amplificaron simultáneamente los 8 loci STR, en una reacción PCR múltiple (Sistema PowerPlex 1.2 Promega) y se utilizó la base de datos de la ATCC para la comparación cuando era posible. Además, se confirmaron los marcadores de subtipo particular de ganancia y pérdida de la expresión, descritos por Hollestelle et al. (14), mediante transferencia de Western así como análisis de micromatrices.

RESULTADOS

Generación de perfiles de viabilidad funcional de cáncer de mama

Para generar perfiles funcionales de cáncer de mama, los inventores utilizaron una estrategia que implica la exploración de viabilidad de ARN de interferencia de alto rendimiento/ARN de interferencia corto (ARNip) de múltiples líneas celulares y la integración de los perfiles de viabilidad con la expresión genética, análisis genético, genómico e histológico (3). Los inventores razonaron que los ARNip que causan una pérdida significativa de la viabilidad celular en todas las líneas celulares ensayadas se dirigen probablemente a genes que tenían una función ubicua esencial en células normales y tumorales. De manera similar, los ARNip que no tenían un efecto significativo sobre la viabilidad en cualquiera de las líneas celulares eran genes no funcionales o esenciales dirigidos. Finalmente, los ARNip que causaban una letalidad significativa en solo algunas, pero no en todas las líneas celulares probablemente identificaban genes que representaban dependencias tumorales específicas y dianas terapéuticas candidatas.

Para generar los perfiles de viabilidad funcional para el cáncer de mama los inventores seleccionaron un panel de 34 líneas celulares derivadas de cáncer de mama y los optimizaron para la exploración de ARNip de alto rendimiento. Posteriormente, se transfectó cada línea celular con una biblioteca de ARNip matrizada en placas de 96 pocillos que se dirigían a las 714 cinasas y genes relacionados con cinasas (véase Métodos). Después de cinco doblajes de población, se estimó la viabilidad celular en cada pocillo mediante el uso de un ensayo de luminiscencia altamente sensible que medía los niveles de ATP. Para identificar los efectos de pérdida de viabilidad/inhibición/fallo para proliferar en cada línea celular, las lecturas de luminiscencia de cada pocillo se transformaron logarítmicamente y entonces se centraron por la mediana de la placa, para tener en cuenta la variación de placa a placa. Para permitir que se comparen los datos entre las diferentes líneas celulares, los datos centrados de cada placa de cada exploración se convencionalizaron por el uso de una estadística de la valoración de Z, donde $Z = 0$ representa ningún efecto sobre la viabilidad y los valores Z negativos representan pérdida de viabilidad. Las exploraciones del ARN de interferencia se llevaron a cabo por triplicado y la comparación de los datos de valoración Z de las exploraciones replicadas de cada línea celular demostraban que el procedimiento de exploración era altamente robusto.

Habiendo explorado y procesado los datos de 34 líneas celulares de cáncer de mama, los inventores seleccionaron 20 para análisis adicionales, basándose en umbrales QC rigurosos (tales como factor Z prima). Este panel encapsulaba cada uno de los grandes subtipos de cáncer de mama (4) e incluía los de receptor hormonal (receptor estrogénico (ER), receptor de progesterona (PR)), positivos a ERBB2 así como modelos negativos ER, PR y ERBB2 (triple negativo), como se caracterizaron por análisis inmunohistoquímicos paralelos, hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y transferencia de Western. Para complementar este perfil de viabilidad funcional, los inventores también caracterizaron el tumor de mama utilizando micromatrices de transcripciones, hibridación genómica comparativa basada en matrices (aCGH), sensibilidad a fármacos para un pequeño número de agentes dirigidos, así como los datos de mutación genética. En las exploraciones de ARNip los inventores utilizaron un umbral riguroso de $Z < -2$ para definir la pérdida de los efectos de viabilidad (aproximadamente igual a $Q = 0,02275$ en una réplica de exploración, y $Q = 1,21 \times 10^{-5}$ en exploraciones por triplicado (5)) e identificaron 330 genes cuyo agotamiento por ARNip producía una pérdida de viabilidad en al menos una línea celular, y 180 genes que producen pérdida de viabilidad en dos o más líneas celulares. Este análisis hacía posible que los inventores identificaran las dependencias predominantes en cada línea celular.

Identificación de dependencias genéticas de facto utilizando el perfil de viabilidad funcional

El trazado de los perfiles de viabilidad funcional del panel para la línea celular de mama proporciona una estructura para identificar dependencias en particular subgrupos definidos genéticamente de la enfermedad. Como prueba de este principio, los inventores utilizaron agrupamiento jerárquico supervisado de los datos de viabilidad y la integración con la secuencia de ADN con los datos de secuenciación de ADN, aCGH, FISH y transferencia de Western para identificar dependencias genéticas adicionales en líneas celulares mutantes de PIK3CA o con ERBB2 amplificado. Las mutaciones somáticas de PIK3CA, que codifica la subunidad catalítica p110 α de la PI3-quinasa, ha demostrado que induce la transformación oncogénica *in vitro* e *in vivo* (6). Las mutaciones PIK3CA se encontraron en un 8 %-35 % de los cánceres de mama humanos haciéndola una de las aberraciones genéticas más comunes de esta enfermedad (7). El agrupamiento jerárquico supervisado de los datos de viabilidad funcional de acuerdo con el estado de mutación de PIK3CA identificaba 30 ARNip que producían pérdida de viabilidad preferentemente en el subgrupo mutante PIK3CA (Fig. 1a). De los 714 genes perfilados en el panel de línea celular, el efecto mutante PIK3CA selectivo clasificado más alto estaba dirigido por el propio PIK3CA ($p = 0,014$; Fig. 1b). En seis de siete líneas mutantes, el ARNip de PIK3CA deba efectos de $Z < -2$, sugiriendo que la dependencia de PIK3CA es uno de los efectos más significativo de las células tumorales mutantes en PIK3CA. Estadísticamente, la probabilidad de oportunidad, Q , de un efecto de ARNip de PIK3CA de < -2 en seis líneas mutantes en PIK3CA derivadas independientemente es aproximadamente una $Q = 1,39 \times 10^{-10}$ (en el que $Z -2$ en una línea celular es aproximadamente igual a un efecto $Q = 0,02275$, o 1 en 44; en seis líneas celulares esto es un efecto de oportunidad $Q = (0,02275)^6$), demostrando una fuerte dependencia del PIK3CA en los cánceres de mama con mutaciones en PIK3CA a pesar de sus antecedentes genéticos diversos. Los inventores también se dieron cuenta que las líneas de cáncer de mama mutantes en PIK3CA eran sensibles preferentemente a los ARNip AKT2 y AKT3 (Fig. 1c). Aunque los mecanismos por los que el PIK3CA mutante media en la transformación celular no se comprenden completamente, es probable que parte de este efecto esté mediado por la señalización mediante AKT (8). La sensibilidad preferente de las células mutantes en PIK3CA al direccionamiento con AKT apoya la hipótesis de que los perfiles de viabilidad tenían la capacidad de iluminar rutas de dependencia verdaderas.

El análisis de los inventores de los perfiles de viabilidad funcional basados en el estado de mutación en PIK3CA también sugieren que las líneas celulares con mutaciones en el dominio quinasa de PIK3CA tienden a ser más sensibles al direccionamiento con el ARNip de PIK3CA que las líneas celulares que albergan mutaciones PIK3CA en el dominio no quinasa. Aunque se han identificado una amplia variedad de mutaciones PIK3CA específicas de tumor, la mayoría se producen en dos puntos clave, sea en el dominio quinasa (por ejemplo, p.H1047R) o el dominio helicoidal (por ejemplo, p.E542K o p.E545K). Se ha sugerido que los mutantes del dominio helicoidal y quinasa tienen fenotipos fisiológicos distintos en células humanas (9, 10), y los efectos diferenciales del direccionamiento de PIK3CA en mutantes del dominio helicoidal frente al dominio quinasa también podría sugerir diferencias en la dependencia a PIK3CA.

La interrogación de los perfiles funcionales también identificaba otros efectos de dependencia a un oncogén bien establecidos. Por ejemplo, aproximadamente el 15 % de los cánceres de mama presentaban una amplificación y sobreexpresión del gen ERBB2 y la dependencia de algunos tipos tumorales a la señalización de ERBB2 es la base para el éxito clínico de los agentes que se dirigen a ERBB2 tales como el trastuzumab y lapatinib. El agrupamiento supervisado de los datos de viabilidad basados en el estado de amplificación de ERBB2 (basado en una integración con los datos de aCGH y FISH identificaban un número de genes que cuando se silenciaban eran selectivamente letales en líneas de cáncer con ERBB2 amplificados (Fig. 1d) Uno de los efectos más dominantes era el direccionamiento del propio ERBB2 ($p = 0,003$), apoyando la hipótesis de que la amplificación de ERBB2 podía dar lugar a un efecto de dependencia oncogénica (Fig. 1d, e). Esto reafirma que la estrategia de los inventores puede ser ventajosa en la identificación de genes funcionalmente relevantes para la viabilidad de la célula tumoral en subgrupos definidos clínicamente. Además, muchas líneas celulares con ERBB2 amplificado son altamente sensibles al ARNip de PIK3CA (Figura 1d) apoyando el desarrollo clínico de los inhibidores de PI3K en cánceres de mama dependientes de ERBB2 independientemente del estado de mutación del PIK3CA.

Las células tumorales de mama con PTEN deficiente son dependientes de la quinasa TTK de punto de control mitótico

Basándose en estos ejemplos de prueba del concepto, los inventores evaluaron si los perfiles de viabilidad funcional se podían utilizar para identificar nuevas dependencias/dianas terapéuticas candidatas que se puedan utilizar en escenarios genéticos o fenotípicos específicos. Para hacerlo, los inventores anotaron el conjunto de datos de viabilidad con mutación genética, la expresión de la transcripción y los datos fenotípicos y entonces utilizaron el agrupamiento jerárquico de los datos de viabilidad para identificar las dependencias genéticas candidatas en diferentes escenarios genéticos. Por ejemplo, integrando los perfiles de viabilidad funcional con perfiles genómicos generados por el perfil de aCGH hacía posible la identificación de dependencias genéticas candidatas para las células tumorales de mama que albergan eventos de amplificación que se encuentran comúnmente en cáncer de mama (11, 12) De manera similar al paradigma del ERBB2, los inventores identificaron dependencias genéticas candidatas asociadas con la amplificación del cromosoma (chr.) 11q13.2-q13.3; la amplificación del chr. 8q23.3-q24.3 que se engloban en el oncogén MYC; la amplificación de FGFR1 en el chr. 8p12; la amplificación de AURKA en el cromosoma 20q13; la amplificación de CDK4 en el chr. 12q14.1; la amplificación del chr. 17q21-q23

englobados en el oncogén PPM1D; y la amplificación de MDM2 en el chr.12q14.3-q15. Un análisis similar permitió a los inventores identificar dependencias candidatas en modelos con eventos supresores tumorales o mutaciones de oncogenes tales como para la mutación de PTEN, mutación CDKN2A (p16), mutación KRAS, mutación p53, mutación BRCA1 o mutación RB. Finalmente, los inventores compararon los perfiles de viabilidad funcional para los subtipos de cáncer de mama definidos por transcripción en micromatrices (por ejemplo ERBB2, negativo básico/triple, estado luminal (13, 14)) para identificar dependencias candidatas en cada grupo.

Para validar su estrategia, los inventores seleccionaron dos dependencias genéticas para un análisis más detallado. Comparando las dependencias genéticas candidatas entre los modelos mutantes en PTEN y los de expresión de PTEN de tipo silvestre (véase la Tabla 1 posterior), los inventores observaron la dependencia aparente de líneas de cáncer de mama mutantes en PTEN para una serie de genes que controlan el punto de control de ensamblaje del huso mitótico. El más significativo entre estas era la dependencia en el gen de la proteína cinasa TTK (15) (aka MPS1) ($p = 0,0012$; Fig. 2a,b). Para afrontar directamente la hipótesis de que la inhibición de la TTK era selectiva para las células de cáncer mutantes en PTEN, los inventores utilizaron líneas cancerosas isogénicas en las que ambas copias del gen PTEN se volvían disfuncionales por direccionamiento genético (16). Los inventores demostraron que el silenciamiento de la TTK con múltiples ARNip (Fig. 2c,d) o la inhibición química de la TTK (15) (utilizando dos inhibidores de la TTK distintos) eran selectivos de la deficiencia de PTEN (Fig. 2e,f), confirmando las observaciones hechas en el panel de línea de cáncer de mama más diverso genéticamente. Esto indicaba que la inhibición de la TTK puede ser una nueva estrategia terapéutica para tratar los tumores mutantes en PTEN. La aneuploidía se observa frecuentemente en los carcinomas de mama humanos con baja expresión de PTEN y en la neoplasia intraepitelial prostática de ratones con Pten mutante (17). Este último fenómeno se explica quizá por la disfunción centromérica en las células tumorales mutantes en PTEN, más probablemente mediado por una pérdida en la interacción entre PTEN y CENP-C, un componente clave del cinetocentro (18). La TTK es necesaria para la función normal del punto de control del huso mitótico y se estableció que la inhibición de la TTK da lugar a la salida temprana de la mitosis y la aneuploidía cromosómica. En las células tumorales con un fenotipo aneuploide, la inhibición de la TTK exacerba adicionalmente la aneuploidía y es particularmente letal (19). Examinando las metafases de las células tumorales deficientes en PTEN expuestas a un inhibidor de la TTK de molécula pequeña, los inventores demostraron que la frecuencia de metafases anormales estaba sustancialmente aumentada en células deficientes en PTEN, lo que puede explicar el efecto de inhibición selectivo deficiente en PTEN de esta cinasa de punto de control mitótico.

El perfil de viabilidad funcional identifica taxonomías funcionales candidatas

Los perfiles de expresión genética y genómicos se habían utilizado para sub-clasificar cánceres de mama. Los inventores investigaron si los patrones de respuesta al silenciamiento genético por el ARNip se podían utilizar también para este fin para definir una "taxonomía funcional". El análisis de agrupamiento jerárquico de los perfiles de transcripción clasifica los tumores de mama y las líneas celulares tumorales en subtipos luminal y molecular tipo basal (14). El agrupamiento jerárquico de genes que cuando se silencian causaban pérdida de viabilidad ($Z < -2$) en dos o más líneas celulares revelaban dos grupos distintos, que se distinguían de los que se formaban por el agrupamiento de los datos de expresión (Fig. 3).

El Grupo 1 estaba enriquecido en las líneas de cáncer de mama con mutaciones en PTEN (5/5 líneas mutantes en PTEN en el grupo 1, $p = 0,0016$), mientras que el Grupo 2 estaba enriquecido en líneas mutantes en PIK3CA (5/7 líneas mutantes en PIK3CA, $p = 0,038$). CAL51 y MDAMB453, que albergaban ambas mutaciones en PTEN y PIK3CA se clasificaron en el Grupo 1. De manera interesante, aunque las líneas celulares con el ERBB2 amplificado se distribuían uniformemente entre los dos grupos, las líneas celulares resistentes al silenciamiento de ARBB2 y también al tratamiento con lapatinib (HCC202, BT474 y SKBR3) se encontraban en el Grupo 2 (Fig. 3b). En general la distinción entre los Grupos 1 y 2 implica que el panel de líneas celulares de cáncer de mama de los inventores se divide en dos grupos de acuerdo con su dependencia en sistemas de cáncer esenciales bien establecidos y es independiente de los subgrupos de cáncer de mama clínicos utilizados actualmente y definidos de manera transcriptómica.

Tabla 1: Estado de PTEN y TTK en el panel de línea celular. La mutación de PTEN, número de copias, expresión (como se evalúa por micromatriz y transferencia de Western) y dependencia de la línea celular a TTK (como se define por el valor de Z y el inhibidor de la TTK) se resumen en la presente tabla. Además, la expresión y número de copias genómicas de la TTK se enumera según se evalúa por micromatriz y aCGH, respectivamente.

Se resaltan cuatro líneas mutantes en PTEN y células CAL51, que tienen una eliminación de PTEN. MUT = mutante, WT = tipo silvestre, ND = no determinado.

| ARNip de la TTK | Mutación en PTEN | Número de copias de PTEN | Expresión relativa de ARNm de PTEN (unidades arbitrarias) | Expresión relativa de ARNm de la TTK (unidades arbitrarias) | Número de copias de la TTK | Sensibilidad al inhibidor de la TTK |
|-----------------|------------------|--------------------------|---|---|----------------------------|-------------------------------------|
|-----------------|------------------|--------------------------|---|---|----------------------------|-------------------------------------|

| Evaluado por : | Valor de Z | secuenciación | aCGH | micromatriz | micromatriz | aCGH | SF50 uM |
|-----------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|
| B120 | -0,92 | WT | Pérdida | 8,18 | 10,11 | Sin cambios | 11,81 |
| BT474 | -0,51 | WT | Sin cambios | 10,10 | 9,87 | Sin cambios | 50,00 |
| CAL120 | 0,90 | WT | Pérdida | 8,25 | 8,87 | Sin cambios | 17,36 |
| CAL91 | -3,10 | ELIMINACIÓN | Sin cambios | 7,96 | 9,68 | Sin cambios | 9,96 |
| CAM41 | -7,83 | T277pì3 | Sin cambios | 8,03 | 8,42 | Pérdida | 27,00 |
| HCC1143 | -0,70 | WT | Sin cambios | 9,84 | 10,55 | Sin cambios | 12,79 |
| HCC202 | -0,63 | WT | Sin cambios | 9,55 | 8,00 | Pérdida | 12,55 |
| HSS781 | -0,61 | WT | Pérdida | 9,06 | 9,69 | Sin cambios | 50,00 |
| JEMT1 | -2,00 | WT | Sin cambios | 8,69 | 7,11 | Sin cambios | 50,00 |
| MCF2 | -2,29 | WT | Sin cambios | 8,90 | 10,01 | Sin cambios | 1,59 |
| MDAMB134 | 0,49 | WT | Sin cambios | 8,85 | 9,07 | Sin cambios | 50,00 |
| MDAMB157 | -0,59 | WT | Pérdida | 8,55 | 10,78 | Ganancia | ND |
| MDAMB231 | -0,30 | WT | Sin cambios | 9,63 | 9,77 | Sin cambios | 15,01 |
| MDAMB453 | -6,26 | E39-7S: | Sin cambios | 9,41 | 9,72 | Sin cambios | 12,55 |
| MDAMB468 | 0,97 | A72fsC<5 | Sin cambios | 9,22 | 10,21 | Ganancia | ND |
| SKBR3 | ND | WT | Pérdida | 8,04 | 8,97 | Sin cambios | 12,57 |
| SUM149 | -1,97 | Mutaciones | Sin cambios | 6,65 | 9,79 | Sin cambios | 14,96 |
| SUM 44 | 1,27 | WT | Sin cambios | 9,33 | 9,41 | Sin cambios | 50,00 |
| T470 | -0,50 | WT | Pérdida | 10,01 | 9,31 | Sin cambios | 7,35 |
| VP229 | -0,09 | WT | Sin cambios | 8,47 | 9,63 | Sin cambios | 16,79 |

Referencias

1. Ashworth A, Lord CJ, Reis-Filho JS. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell* 2011;145:30-8.
2. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:463-75.
3. Iorns E, Lord CJ, Grigoriadis A, McDonald S, Fenwick K, Mackay A, et al. Integrated functional, gene expression and genomic analysis for the identification of cancer targets. *PLoS One* 2009;4:e5120.
4. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006;10:515-27.
5. Boutros M, Bras LP, Huber W. Analysis of cell-based RNAi screens. *Genome Biol* 2006;7:R66.
6. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 2008;27:5486-96.
7. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:6084-91.
8. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-74.
9. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2652-7.
10. Pang H, Flinn R, Patsialou A, Wyckoff J, Roussos ET, Wu H, et al. Differential enhancement of breast cancer cell motility and metastasis by helical and kinase domain mutations of class IA phosphoinositide 3-kinase. *Cancer Res* 2009;69:8868-76.
11. Natrajan R, Weigelt B, Mackay A, Geyer FC, Grigoriadis A, Tan DS, et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-

- like, HER2 and luminal cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:575-89.
12. Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2010;10:59-64.
- 5 13. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74.
14. Hollestelle A, Nagel JH, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, et al. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*;121:53-64.
15. Hewitt L, Tighe A, Santaguida S, White AM, Jones CD, Musacchio A, et al. Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J Cell Biol* 2010;190:25-34.
- 10 16. Lee C, Kim JS, Waldman T. PTEN gene targeting reveals a radiation-induced size checkpoint in human cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:6906-14.
17. Puc J, Parsons R. PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. *Cell Cycle* 2005;4:927-9.
18. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 2007;128:157-70.
- 15 19. Kwiatkowski N, Jelluma N, Filippakopoulos P, Soundararajan M, Manak MS, Kwon M, et al. Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function. *Nat Chem Biol* 2010;6:359-68.
20. Lagier-Tourenne C, Tazir M, Lopez LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, et al. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 2008;82:661-72.
21. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009;360:790-800.
22. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Geneexpression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-9.
- 25 23. Sims D, Bursteinas B, Gao Q, Jain E, Mackay A, Mitsopoulos C, et al. ROCK: a breast cancer functional genomics resource. *Breast Cancer Res Treat* 2010.
24. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 1999;4:67-73.
25. Iorns E, Turner NC, Elliott R, Syed N, Garrone O, Gasco M, et al. Identification of CDK10 as an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13:91-104.
- 30 26. Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, et al. A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J* 2008;27:1368-77.
27. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;434:917-21.
- 35 28. Natrajan R, Weigelt B, Mackay A, Geyer FC, Grigoriadis A, Tan DS, et al. An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. *Breast Cancer Res Treat*;121:575-89.
29. Geyer FC, Weigelt B, Natrajan R, Lambros MB, de Biase D, Vatcheva R, et al. Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas. *J Pathol*;220:562-73.
- 40 30. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 1990;9:811-8.
31. Natrajan R, Lambros MB, Rodriguez-Pinilla SM, Moreno-Bueno G, Tan DS, Marchio C, et al. Tiling path genomic profiling of grade 3 invasive ductal breast cancers. *Clin Cancer Res* 2009;15:2711-22.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer inhibiendo dicha proteína cinasa TTK, en donde el cáncer es un cáncer con el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) mutado o deficiente.
2. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer con PTEN deficiente es un cáncer con PTEN anulado o el PTEN mutado que comprende una mutación de truncado o una o más sustituciones.
3. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer con el PTEN mutante o deficiente afecta a los ganglios autónomos, tracto biliar, hueso, mama, SNC, cuello uterino, endometrio, ojo, tejido hematopoyético y linfóide, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, meninges, esófago, ovario, páncreas, próstata, glándula salivar, piel, tejidos blandos, estómago, testículo, tiroides, tracto aerodigestivo superior, tracto urinario o vulva.
4. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer con el PTEN mutante o deficiente es cáncer de mama, carcinoma endometrial, glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de colon o cáncer de pulmón.
5. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- (a) el inhibidor es un ácido nucleico inhibidor, un anticuerpo, una molécula pequeña, tal como AZ3146 o CCT132774, o un péptido; o
- (b) el inhibidor es un ácido nucleico inhibidor que es una molécula de ARNi o una molécula de ARNip o una molécula de ARNhp.
6. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento con un inhibidor de la cinasa mitótica se combina con una terapia anti-cáncer adicional, opcionalmente en donde el tratamiento con un inhibidor de la cinasa mitótica se utiliza junto con un agente quimioterápico adicional.
7. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agente quimioterápico adicional es Amsacrina (Amsidina), Bleomicina, Busulfan, Capecitabina (Xeloda), Carboplatino, Carmustina (BCNU), Clorambucilo (Leukeran), Cisplatino, Cladribina (Leustat), Clofarabina (Evoltra), Crisantaspasa (Erwinasa), Ciclofosfamida, Citarabina (ARA-C), Dacarbazina (DTIC), Dactinomicina (Actinomicina D), Daunorrubicina, Docetaxel (Taxotere), Doxorrubicina, Epirubicina, Etopósido (Vepesid, VP-16), Fludarabina (Fludara), Fluorouracilo (5-FU), Gemcitabina (Gemzar), Hidroxiurea (Hidroxycarbamida, Hidrea), Idarrubicina (Zavedos), Ifosfamida (Mitoxana), Irinotecan (CPT-11, Campto), Leucovorin (ácido folínico), doxorrubicina liposómica (Caelix, Miocet), daunorrubicina liposómica (DaunoXome®) Lomustina, Melfalan, Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Mitomicina, Mitoxantrona, Oxaliplatino (Eloxatin), Paclitaxel (Taxol), Pemetrexed (Alimta), Pentostatina (Nipent), Procarbazina, Raltitrexed (Tomudex®), Streptozocin (Zanosar®), Tegafururacilo (Uftoral), Temozolomida (Temodal), Teniposida (Vumon), Tiotepa, Tioguanina (6-TG) (Lanvis), Topotecan (Hicamin), Treosulfan, Vinblastina (Velbe), Vincristina (Oncovin), Vindesina (Eldisina) o Vinorelbina (Navelbina).
8. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el agente quimioterápico adicional es 5FU un inhibidor de BCL-XL, un inhibidor de BCR-ABL, cKIT o PDGFR, un inhibidor de CDK, un inhibidor de CHK, un inhibidor de COX2, un inhibidor de EGFR, un agente dirigido a HER2, un inhibidor de HSP, inhibidores de hTERT, un inhibidor deIDO, un agente dirigido a MDM2, metotrexato, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de PARP, un inhibidor de PI3K, una sal de platino, un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de RAR o de RXR, un inhibidor de SRC, un inhibidor de TGFB2, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor de VEGF, RAF, cKIT o PDGFR, o un mimético de SMC.
9. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende la etapa de determinar si el individuo tiene un cáncer con el PTEN mutado o deficiente.
10. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la determinación de si el individuo tiene un cáncer con el PTEN mutado o deficiente comprende la medición de la expresión proteica del PTEN en una muestra obtenida del individuo para determinar si la proteína de PTEN está mutada o es deficiente; y opcionalmente en donde la determinación de la expresión proteica del PTEN comprende una o más de entre determinar la expresión proteica del PTEN en una muestra tumoral utilizando inmunohistoquímica, determinar la expresión proteica del PTEN que comprende la medición de los niveles proteicos de PTEN en un lisado celular por

ELISA o transferencia de Western, y/o determinar la expresión proteica del PTEN que comprende la utilización de un agente de unión capaz de unirse específicamente a la proteína del PTEN, o un fragmento del mismo.

5 11. El inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la determinación de si el individuo tiene un cáncer con el PTEN mutado o deficiente se lleva a cabo en un ácido nucleico genómico extraído de una muestra de células obtenidas del cáncer de mama o de una muestra de células cancerosas circulantes en la sangre; y opcionalmente en donde la determinación de la expresión del gen PTEN comprende la extracción de ARN de una muestra de células cancerosas y la medición de la expresión por PCR en tiempo real y/o utilizando una sonda capaz de hibridarse al ARN de PTEN, estando opcionalmente la sonda inmovilizada en una micromatriz.

15 12. el inhibidor de la proteína cinasa TTK para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende la etapa inicial de obtención de una muestra de dicho individuo, opcionalmente en donde la muestra es una muestra tumoral, una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra celular.

20 13. Un método de exploración de agentes útiles en el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente, empleando el método una primera y una segunda líneas celulares, en donde la primera línea celular es PTEN y la segunda línea celular tiene el PTEN competente, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto la primera y la segunda líneas celulares de mamífero con al menos un agente candidato;
- (b) determinar la cantidad de muerte celular en la primera y la segunda líneas celulares;
- (c) seleccionar un agente candidato que sea sintéticamente letal en la primera línea celular; y
- (d) determinar si el agente candidato seleccionado en la etapa (c) es un inhibidor de la proteína cinasa TTK.

25 14. Un método de exploración de agentes útiles en el tratamiento de un cáncer con el PTEN mutado o deficiente, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto la proteína cinasa TTK con al menos un agente candidato;
- (b) determinar un efecto del al menos un agente candidato sobre una actividad de la proteína cinasa TTK; y
- (c) seleccionar un agente candidato que inhiba la actividad de la cinasa mitótica que sea útil para el tratamiento del cáncer con el PTEN mutado o deficiente.

35 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende adicionalmente la etapa de poner en contacto un agente candidato seleccionado en la etapa (c) con una línea celular de cáncer con el PTEN mutado o deficiente para determinar si el agente candidato es citotóxico para la línea celular cancerosa.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que:

- (a) el agente candidato es un inhibidor del ácido nucleico candidato, un anticuerpo candidato, o una molécula pequeña candidata o un péptido candidato; y/o
- (b) el agente candidato es un compuesto que es parte de una biblioteca de compuestos y opcionalmente en donde el compuesto candidato tiene un peso molecular de menos de 100 Da; y/o
- (c) el agente candidato o el compuesto candidato es un fármaco aprobado para su uso en el tratamiento del cáncer.

50 17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que comprende adicionalmente la determinación de si un agente candidato no es letal para las células normales y/o la determinación del efecto de combinaciones de dos o más compuestos candidatos sobre las líneas celulares o las dianas proteicas.

Figura 1

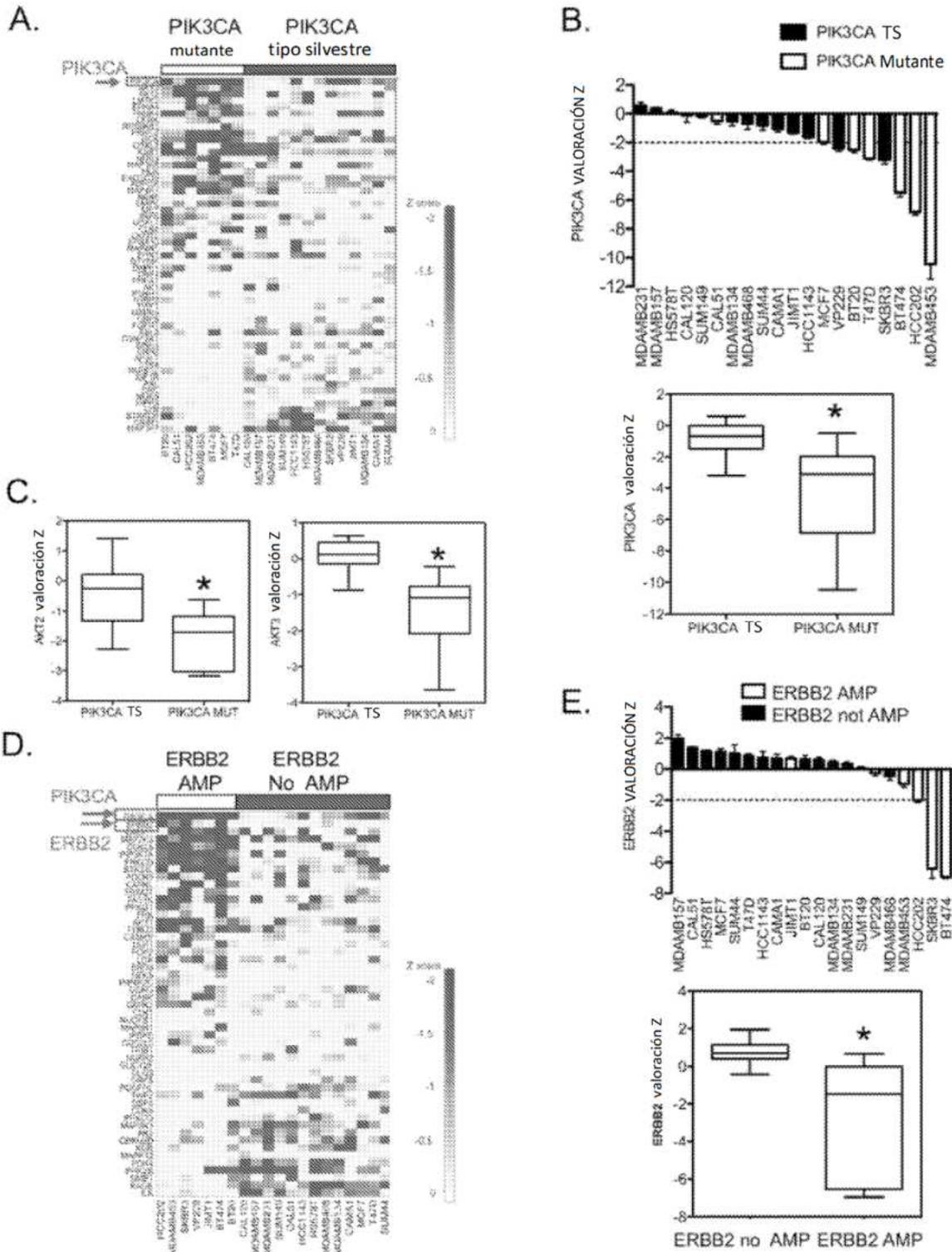


Figura 2.

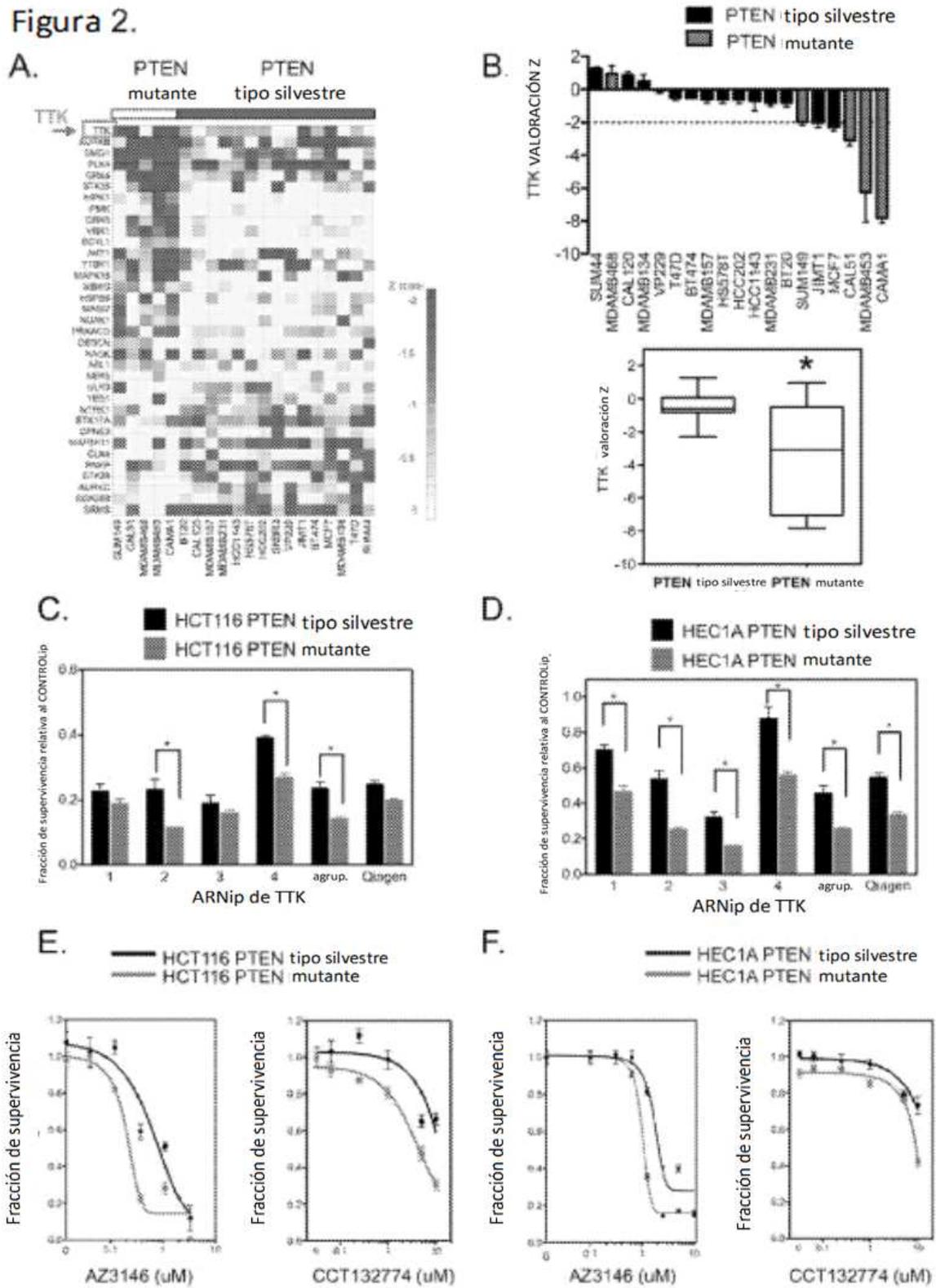


Figura 3

