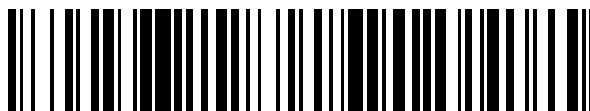


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 081**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012** **PCT/US2012/031662**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012** **WO12135749**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012** **E 12765178 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 2694959**

54 Título: **Biomarcadores para predecir sensibilidad a tratamientos para el cáncer**

30 Prioridad:

01.04.2011 US 201161471036 P

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

19.06.2020

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

LIN, KUI;
PUNNOOSE, ELIZABETH y
SESHAGIRI, SOMASEKAR

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 768 081 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

Biomarcadores para predecir sensibilidad a tratamientos para el cáncer

5 **Antecedentes**

El cáncer puede surgir cuando las células tienen mutaciones que por último lugar confieren una ventaja de crecimiento a las células. Las mutaciones somáticas incluyen, por ejemplo, sustituciones, deleciones, inserciones, amplificaciones y transposiciones de bases de nucleótidos. La identificación de mutaciones somáticas que ocurren en el cáncer proporciona una valiosa información referente al desarrollo del cáncer. Dicha información también es útil para la identificación de marcadores de diagnóstico y dianas terapéuticas en el cáncer (véase, por ejemplo, Bamford et al. (2004) British Journal of Cancer 91:355-358.) La identificación de mutaciones somáticas asociadas al cáncer ha demostrado ser valiosa en la práctica clínica, por ejemplo, en distinguir poblaciones de pacientes que serían sensibles a una terapia particular (véase, por ejemplo, Lynch et al. (2004) N. Engl. J. Med. 350:2129-2139; O'Hare (2004) Blood 104:2532-2539.) Así, existe una necesidad continua de identificar mutaciones somáticas que ocurren en el cáncer.

Las variaciones, o polimorfismos, de la línea germinal son variaciones heredables que están presentes en un genoma del organismo. Los polimorfismos incluyen polimorfismos en la longitud del fragmento de restricción (RFLPs), repeticiones cortas en tándem (STRs) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). También se pueden asociar variaciones de la línea germinal a susceptibilidad a ciertas enfermedades, que incluyen cáncer (véase, por ejemplo, Vierimaa et al. (2006) Science 312:1228-1230; Landi et al. (2006) Science 313:521-522; Zhu et al. (2004) Cancer Research 64:2251-2257.) Así, existe una necesidad continua de identificar polimorfismos asociados al cáncer.

Josep Tabernero et al., "Targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway with GDC-0068, a novel selective ATP competitive Akt inhibitor" - URL: [http:// www.arraybiopharma.com/files/2013/9810/8011/PubAttachment437.pdf](http://www.arraybiopharma.com/files/2013/9810/8011/PubAttachment437.pdf) es una presentación que indica que GDC-0068 es un inhibidor de AKT competitivo de ATP selectivo oral.

El documento de patente WO 2008/049022 describe un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen AKT1 que se puede usar para determinar si un sujeto se puede tratar (o es resistente a tratamiento con) un agente quimioterapéutico.

35 **Sumario de ciertas realizaciones de la invención**

Las invenciones descritas en el presente documento cumplen las necesidades anteriormente descritas y proporcionan otros beneficios.

Los solicitantes han descubierto que los biomarcadores pueden predecir la eficacia de inhibidores de AKT en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos, tales como el cáncer.

Los solicitantes han descubierto que ciertas mutaciones en AKT pueden conducir a interacciones alteradas entre el dominio PH y el dominio cinasa de AKT. Una alteración entre estos dominios, provocada por la(s) mutación (mutaciones), parece conducir a una fosforilación constitutiva de AKT y a señalización constitutiva de AKT. Estos efectos también permiten la transformación de células. Estas mutaciones confieren resistencia a inhibidores alostéricos de PI3K y Akt. Por consiguiente, la presencia de dichas mutaciones indica que la dosificación eficaz para inhibidores alostéricos de PI3K y Akt será mayor, y también indica que se deben usar inhibidores distintos de inhibidores alostéricos de PI3K y/o Akt, tales como inhibidores de Akt competitivos por ATP. El uso de este biomarcador, tanto solo como en combinación con otros biomarcadores descritos en el presente documento, es útil para predecir la sensibilidad del crecimiento de una célula tumoral a un inhibidor de AKT, administrado o solo, o en combinación con otro compuesto terapéutico, tal como 5-FU, un agente de platino (carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, etc.) irinotecán, docetaxel, doxorubicina, gemcitabina, SN-38, capecitabina, temozolomida, erlotinib, PD-0325901, paclitaxel, bevacizumab, pertuzumab, tamoxifeno, rapamicina, lapatinib, PLX-4032, MDV3100, abiraterona y GDC-0973, y otros inhibidores de MEK.

La presente invención comprende un método de predicción de la sensibilidad del crecimiento de una célula tumoral a un inhibidor de AKT según la reivindicación 1. La invención también proporciona GDC-0068 o una sal del mismo para su uso en un método de tratamiento de una célula cancerosa según la reivindicación 13.

60 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 representa AKT y las interacciones del dominio PH y cinasa (1A y 1B) y también representa las localizaciones de las interacciones entre aquellos dominios (1C).

La Figura 2 representa resultados que indican que mutaciones sintéticas en sitios que se cree que alteran las interacciones del dominio PH con el dominio cinasa conducen a fosforilación constitutiva de Akt.

La Figura 3 representa mutaciones somáticas.

La Figura 4 representa resultados que indican que las mutaciones somáticas, que conducen a la fosforilación de Akt constitutiva, conducen a la señalización de Akt constitutiva.

La Figura 5 representa resultados que indican que los mutantes de Akt1 pueden transformar células.

La Figura 6 representa resultados que indican que los mutantes de Akt1 confieren resistencia a inhibidores de PI3K y a inhibidores alostéricos de AKT.

La Figura 7 representa cambios en pPRAS40 T246 en tumores de pacientes tratados con GDC-0068.

La Figura 8 representa tumores con una vía de PI3K/AKT activada.

La Figura 9 representa resultados que indican que un alto perfil de actividad de AKT predice sensibilidad a GDC-0068.

La Figura 10 representa resultados que demuestran una fuerte correlación con la pérdida de PTEN y sensibilidad a GDC-0068 en líneas de células de próstata y ovario. Los resultados son de una respuesta a dosis del compuesto individual normalizado en GDC-0068.

La Figura 11 representa resultados que demuestran que la pérdida de PTEN y las mutaciones de PIK3CA están fuertemente correlacionadas con la sensibilidad al agente individual GDC-0068 *in vitro*.

La Figura 12A y 12B representa resultados de la actividad del agente individual GDC-0068 en modelos de xenoinjerto (12A) y los datos de cribado de la línea celular *in vitro* (12B) que indican que el porcentaje más alto de la inhibición del crecimiento tumoral también tiene evidencia de la activación de la vía o por pérdida de PTEN o mutación de PI3K. Se observa la fuerte eficacia en los modelos con la activación de la vía de AKT (y sin activación de la vía de MEK).

La Figura 13 representa resultados que indican una correlación negativa entre GDC-0068 y la sensibilidad del agente individual del inhibidor de MEK de una variedad de líneas celulares.

La Figura 14 representa resultados que demuestran una fuerte sinergia en líneas celulares con la activación de la vía de AKT (pérdida de PTEN, mutaciones de PI3K). El análisis BLISS indica una amplia sinergia para GDC-0068 en combinación con un inhibidor de MEK (GDC-0973).

La Figura 15 representa resultados de que los efectos de combinación de GDC-0068 con cisplatino + 5FU están asociados con la activación de la vía de AKT. Los cribados combinados con 5FU/cisplatino (FOLFOX) muestran evidencia de efectos aditivos. Los efectos aditivos están asociados con la activación de la vía: mutación de PTEN, pAKT, PI3K.

Figura 16 Las mutaciones del sitio de contacto del dominio PH-cinasa conducen a la activación de AKT. (A) La proliferación independiente de IL-3 de células BaF3 que expresan establemente el vector vacío (EV), mutante (WT), miristoilado (Myr) o E17K AKT1 solo o en combinación con MEK1 N3. (B) Una representación de "libro abierto" de PH y KD de AKT1 en complejo con un inhibidor alostérico (código de acceso de PDB 3096). (C) Esquema que representa el cribado usado para evaluar el efecto de las mutaciones de la interfase PH-KD de AKT1. (D) Las mutaciones de la interfase PH-KD promueven la proliferación independiente de IL-3 de células BaF3. (E) El análisis de inmunotransferencia de células NIH3T3 que expresa establemente vector vacío y las construcciones de AKT1 indicadas.

Figura 17. Mutaciones de AKT somáticas en cáncer humano. Mutaciones somáticas en miembros de la familia AKT. Las barras negras horizontales indican restos conservados a través de AKT 1, 2 y 3.

Descripción detallada

Los recientes estudios estructurales indican que las interacciones inhibitoras entre dominios desempeñan una función crucial en la regulación de la activación de AKT. Usando un cribado mutacional, se muestra aquí que la activación de AKT puede resultar de mutaciones en restos implicados en los contactos de dominios PH-cinasa. Además, se informa de la identificación de novedosas mutaciones en cánceres humanos, algunos de las cuales implican restos en la interfase PH-KD.

Además de la mutación E17K previamente identificada, el mutante L52R del dominio PH de AKT1 y el mutante del dominio cinasa D323H identificados en muestras clínicas median en la transformación celular y son oncogénicos *in vivo*. La inspección de la estructura de AKT1 de longitud completa revela que E17, L52 y D323 se encuentran en la interfase PH-KD y se predice que sustituciones en estas posiciones perturban la unión de PH-KD. De acuerdo con esto, tanto L52R como D323H debilitan la unión PH-KD en ensayos de 2 híbridos. Previamente, el mecanismo de activación de E17K se ha atribuido a una especificidad de unión de lípidos alterados. Estos resultados indican perturbación de las interacciones entre dominios por ser un mecanismo adicional que subyace a la activación de E17K. Tomados conjuntamente, estos hallazgos sugieren que la oncogenicidad de las mutaciones de la interfase PH-KD de AKT1 identificadas aquí procede de la desestabilización de contactos entre dominios.

Los inhibidores que dirigen los miembros de la vía de PI3K-AKT que incluyen AKT están actualmente en diversas etapas de desarrollo. Estudios previos han mostrado que los inhibidores alostéricos de AKT requieren una interfase PH-KD intacta, ya que dichos inhibidores se unen preferencialmente a la conformación de "PH-dentro" cerrada. De acuerdo con esto, las mutaciones en AKT que favorecen una conformación abierta ("PH-fuera") muestran sensibilidad reducida a inhibidores de AKT alostéricos, aunque retienen la sensibilidad a inhibidores competitivos de ATP. Esto indica que el estado mutacional de AKT tiene importantes implicaciones para la elección de inhibidor en la clínica. Las mutaciones de AKT, aunque pueden funcionar como conductores en tumores intactos, también pueden surgir en tumores en respuesta a agentes que dirigen componentes aguas arriba de la vía de AKT.

En ciertas realizaciones, la presencia de mutaciones B-Raf o K-Ras son factores pronósticos negativos (es decir, contraindicados) y los pacientes se deben seleccionar fuera del grupo de tratamiento para recibir inhibidores de AKT, tales como GDC-0068.

5 GDC-0068, e inhibidores competitivos de ATP similares, dirigen preferencialmente Akt activa y bloquean Akt en un estado hiperfosforilado, pero inactivo, bloqueando la desfosforilación. Se puede usar un aumento en pAkt como biomarcador farmacodinámico ("biomarcadores PD") para los efectos de GDC-0068 e inhibidores competitivos de ATP similares.

10 En ciertas realizaciones de la invención, se pueden usar pGSK-3 β o PRAS40 como biomarcadores farmacodinámicos para inhibidores de AKT, tales como GDC-0068. Además, en ciertas realizaciones, se puede determinar la apropiada dosificación de un compuesto, tal como GDC-0068, y se ajusta basándose en la inhibición de una vía de AKT, usando biomarcadores de PD, por ejemplo, pGSK-3 β o PRAS40 (véase la Figura 7).

15 También se propone que GDC-0068 e inhibidores competitivos de ATP similares son más activos contra Akt hiperactivada.

El direccionamiento preferencial de Akt activa puede actuar en concierto con la adición de oncogenes para aumentar el índice terapéutico de GDC-0068 e inhibidores competitivos de ATP similares para tumores, con altos niveles en el estado estacionario de Akt activa, que incluye los provocados por mutaciones de Akt, pérdida de PTEN (o hemigigótico u homocigótico), pérdida de la función de INPP4B, pérdida de la función de PHLPP, pérdida de la función de PP2A, mutaciones de PI3K y amplificación de Her2 y/o Her3.

25 La eficacia de GDC-0068 se predice en tumores que son nulos para PTEN o tienen mutaciones de PI3k, por ejemplo en cáncer de próstata, mama y ovario.

La pérdida de PTEN es un biomarcador que predice la sinergia con inhibidores de MEK, por ejemplo en cáncer pancreático.

30 Por consiguiente, la actividad de GDC-0068 está asociada, por ejemplo, selectivamente asociada, con la activación de la vía AKT. La evidencia de esta relación se demostró en líneas celulares y estudios de xenoinjerto.

La pérdida de PTEN, mutaciones del dominio cinasa de PI3K y altos niveles de pAKT son marcadores importantes que predicen la actividad de un compuesto, por ejemplo, como un único agente; con efectos aditivos con combinaciones de compuestos quimioterapéuticos, y con efectos sinérgicos, por ejemplo, con inhibidores de MEK. De forma interesante, se observa sinergia con un inhibidor de MEK con activación de la vía de MEK. En cambio, la activación de la vía de MEK (por ejemplo, KRAS/BRAF) son marcadores de resistencia a actividad de agente individual (por ejemplo, GDC-0068). Otros posibles factores pronósticos de la actividad de un compuesto, por ejemplo, actividad de GDC-0068, incluyen la activación de la vía conducida por RTK (HER2 en mama, HER2 y Met en cáncer gástrico), mutaciones E17K de AKT1, amplificaciones de AKT2, expresión en exceso de AKT3 y amplificaciones de PI3K.

TABLA A Actuales estimaciones de prevalencia de biomarcadores para cáncer gástrico, de próstata y pancreático, basado en informes de la bibliografía

	Gástrico	CRPC	Pancreático
Pérdida de PTEN	40 %	75-100 %	20-75 %
Mutación de PI3K	8 %	2 %	
Amplificación de PI3K	36 %		
Amplificación de AKT	20 %		20 %
Mutación KRAS			90 %

45 Para los fines de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, siempre que sean apropiadas, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el supuesto caso de que cualquier definición expuesta a continuación entre en conflicto con cualquier documento denominado en el presente documento, debe controlar la definición expuesta a continuación.

50 El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura de nucleótido se puede conferir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapas", sustitución de uno o más de los nucleótidos que existen de forma natural con un análogo,

modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas sin modificar del (de los) polinucleótido(s). Además, se puede sustituir cualquiera de los grupos hidroxilo presentes, en general, en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar con soportes sólidos. El OH del extremo 5' y 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupos de remate orgánicos de desde 1 hasta 20 átomos de carbono. También se pueden derivatizar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que, en general, se conocen en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos de azúcar, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilasas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como metilribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en donde el fosfato está sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o sin sustituir que opcionalmente contiene un enlace éter (--O--), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos denominados en el presente documento, que incluyen ARN y ADN.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a polinucleótidos monocatenarios cortos, que tienen al menos aproximadamente siete nucleótidos de longitud e inferiores a aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser sintéticos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y completamente aplicable a oligonucleótidos.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido monocatenario que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico y que permite la polimerización de un ácido nucleico complementario proporcionando, en general, un grupo 3'-OH libre.

El término "variación de nucleótido" se refiere a un cambio en una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, una inserción, delección, inversión, o sustitución de uno o más nucleótidos, tal como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)) con respecto a una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia no mutante). El término también engloba el cambio correspondiente en el complemento de la secuencia de nucleótidos, a menos que se indique lo contrario. Una variación de nucleótidos puede ser una mutación somática o un polimorfismo de la línea germinal.

El término "variación de aminoácido" se refiere a un cambio en una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una inserción, sustitución, o delección de uno o más aminoácidos, tal como una delección interna o una truncación del extremo N o C) con respecto a una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia no mutante).

El término "detección" incluye cualquier medio de detección, que incluye detección directa e indirecta.

El término "diagnóstico" se usa en el presente documento para referirse a la identificación o clasificación de un estado, enfermedad o afección molecular o patológica. Por ejemplo, "diagnóstico" se puede referir a la identificación de un tipo particular de cáncer, por ejemplo, un cáncer de pulmón. "Diagnóstico" también se puede referir a la clasificación de un tipo particular de cáncer, por ejemplo, por histología (por ejemplo, un carcinoma de pulmón de células no pequeñas), por características moleculares (por ejemplo, un cáncer de pulmón caracterizado por variación (variaciones) de nucleótidos y/o aminoácidos en un gen o proteína particular), o ambos.

El término "pronóstico" se usa en el presente documento para referirse a la predicción de la probabilidad de muerte o progresión atribuible al cáncer, que incluye, por ejemplo, reaparición, diseminación metastásica y resistencia a fármaco, de una enfermedad neoplásica, tal como cáncer.

El término "predicción" o (y variaciones tales como predecir) se usa en el presente documento para referirse a la probabilidad de que un paciente responda o favorablemente o desfavorablemente a un fármaco o conjunto de fármacos. En una realización, la predicción se refiere al grado de aquellas respuestas. En otra realización, la predicción se refiere a si y/o la probabilidad de que un paciente sobreviva tras el tratamiento, por ejemplo tratamiento con un agente terapéutico particular y/o retirada quirúrgica del tumor primario, y/o quimioterapia durante un cierto periodo de tiempo sin reaparición del cáncer. Los métodos predictivos de la invención se pueden usar clínicamente para tomar decisiones de tratamiento eligiendo las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos predictivos de la presente invención son herramientas valiosas en la predicción de

si es probable que un paciente responda favorablemente a una pauta de tratamiento, tal como una pauta terapéutica dada, que incluye, por ejemplo, la administración de un agente terapéutico dado o la combinación, intervención quirúrgica, quimioterapia, etc., o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente, siguiendo una pauta terapéutica.

5 Los términos "trastorno proliferativo de células" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con un grado medible de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo de células es cáncer.

10 "Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento celular neoplásico y proliferación, tanto maligno como benigno, y todos los tejidos de células pre-cancerosas y cancerosas. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo de células", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes, como se denomina en el presente documento.

15 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado y proliferación. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de los cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, 20 cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, carcinoma de células renales, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer pancreático, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama endocrino resistente), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, melanoma, leucemia 25 y otros trastornos linfoproliferativos, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

El término "tumor de pulmón" se refiere a cualquier tumor de pulmón, que incluye, pero no se limita a, carcinoma de pulmón de células pequeñas y carcinoma de pulmón no de células pequeñas, incluyendo el último, pero no se limita a, adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de células grandes.

30 El término "neoplasia" o "célula neoplásica" se refiere a un tejido anormal o célula que prolifera más rápidamente que los tejidos o células normales correspondientes y continúa creciendo después de retirar el estímulo que inició el crecimiento.

35 Una "célula de tumor de pulmón" se refiere a una célula de tumor de pulmón, o *in vivo* o *in vitro*, y engloba células derivadas de tumores primarios de pulmón o tumores metastásicos de pulmón, así como líneas celulares derivadas de dichas células.

40 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o célula que está tratándose, y se puede realizar o para la profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la manifestación o reaparición de la enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado.

45 Un "individuo", "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (tales como vacas), animales para deportes, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates (incluyendo primates humanos y no humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, un mamífero es un ser humano y pueden ser o un varón o una 50 hembra.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

55 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz engloba una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de 60 tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz sería inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

El término supervivencia "a largo plazo" se usa en el presente documento para referirse a la supervivencia durante al 65 menos 1 año, 5 años, 8 años, o 10 años tras el tratamiento terapéutico.

El término "resistencia aumentada" a un agente particular terapéutico u opción de tratamiento, cuando se usa según la invención, significa la disminución de la respuesta a una dosis estándar del fármaco o a un protocolo estándar de tratamiento.

5 El término "sensibilidad reducida" a un agente terapéutico particular u opción de tratamiento, cuando se usa según la invención, significa la disminución de la respuesta a una dosis estándar del agente o un protocolo estándar de tratamiento, donde la disminución de la respuesta puede ser compensada (al menos parcialmente) aumentando la dosis del agente, o la intensidad del tratamiento.

10 La "respuesta del paciente" se puede evaluar usando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio al paciente, que incluye, sin limitación, (1) inhibición, de algún modo, del crecimiento tumoral, que incluye la ralentización o detención completa del crecimiento; (2) reducción en el número de células tumorales; (3) reducción en el tamaño del tumor; (4) inhibición (por ejemplo, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células tumorales en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; (5) inhibición (por ejemplo, reducción, ralentización o detención completa) de metástasis; (6) potenciamiento de la respuesta inmunitaria antitumoral, que puede, pero no tiene que, dar como resultado la regresión o el rechazo del tumor; (7) alivio, de algún modo, de uno o más síntomas asociados al tumor; (8) aumento en la duración de la supervivencia tras el tratamiento; y/o (9) disminución de la mortalidad en un momento de tiempo dado tras el tratamiento.

20 Los "anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) se refieren a glucoproteínas que tienen características estructurales similares. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que, en general, carecen de especificidad por antígenos. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a elevados niveles por mielomas.

25 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos mientras que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describen en mayor detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

30 "FOXO3a" se refiere a una proteína de la clase O de caja de cabeza de tenedor/hélice alada que es una diana aguas abajo de la vía de señalización de cinasa PI3K/AKT. La cinasa AKT activada controla directamente la actividad de FOXO3a mediante fosforilación, que conduce a su translocación al citoplasma, donde es secuestrada por la proteína chaperona 14-3-3. La inhibición de cinasas PI3K/AKT conduce a la desfosforilación y localización nuclear de FOXO3a, dando como resultado su activación. La localización nuclear de FOXO3a permite que actúe de factor de transcripción para inducir la parada del ciclo celular y/o la apoptosis mediante la regulación por incremento de sus genes diana clave, tales como p27Kip1 y Bim.

40 "Perfil de localización" se refiere a la cantidad de una molécula dada en una localización en comparación con la cantidad en una segunda localización. En un ejemplo, un perfil de localización de FOXO3a se refiere a la cantidad de FOXO3a en el núcleo celular en comparación con la cantidad en el citoplasma celular. El perfil de localización se puede expresar en términos de una relación (por ejemplo, cantidad de FOXO3a en el núcleo dividida entre la cantidad de FOXO3a en el citoplasma) o una resta (por ejemplo, cantidad de FOXO3a en el núcleo menos la cantidad de FOXO3a en el citoplasma). Un "perfil de localización nuclear" se refiere a un perfil de localización que se determina que tiene niveles de FOXO3a que son sustancialmente más altos en el núcleo que en el citoplasma. En un ejemplo, un perfil de localización nuclear tiene más de aproximadamente 50 % de FOXO3a en el núcleo que en el citoplasma. En otros ejemplos, un perfil de localización nuclear tiene más de aproximadamente 70 %, alternativamente más de aproximadamente 80 %, alternativamente más de aproximadamente 90 % de FOXO3a en el núcleo que en el citoplasma. Un "perfil de localización citoplásmica" se refiere a un perfil de localización que se determina que tiene niveles de FOXO3a que son sustancialmente más altos en el citoplasma que en el núcleo. En un ejemplo, un perfil de localización citoplásmico tiene más de aproximadamente 50 % de FOXO3a en el citoplasma que en el núcleo. En otros ejemplos, un perfil de localización citoplásmica tiene más de aproximadamente 70 %, alternativamente más de aproximadamente 80 %, alternativamente más de aproximadamente 90 % de FOXO3a en el citoplasma que en el núcleo.

55 Un aspecto incluye, por tanto, un método de predicción de la sensibilidad del crecimiento de células tumorales a la inhibición por un inhibidor de la vía de cinasa AKT, que comprende: determinar el perfil de localización de FOXO3a en una célula tumoral, en donde un perfil de localización citoplásmica de FOXO3a se correlaciona con sensibilidad a la inhibición por un inhibidor de cinasas AKT, y un perfil de localización nuclear de FOXO3a se correlaciona con resistencia a la inhibición por un inhibidor de cinasas AKT.

60 "Perfil de pAKT" se refiere al nivel de activación o fosforilación de AKT ("pAKT") en comparación con el nivel de AKT no activado o no fosforilado en una muestra dada. En un ejemplo, la muestra es una célula tumoral. El perfil de pAKT se puede expresar en términos de una relación (por ejemplo, cantidad de pAKT en una célula tumoral dividida

entre la cantidad de AKT no fosforilada en la célula o en una célula no tumoral del mismo tipo) o una resta (por ejemplo, cantidad de pAKT en una célula tumoral menos la cantidad de AKT no fosforilada en la célula o en una célula no tumoral del mismo tipo). El perfil de pAKT también se puede expresar en términos del nivel de activación de la vía midiendo las cantidades de dianas aguas abajo fosforiladas de AKT (por ejemplo, pGSK o PRAS40). Un "perfil alto de pAKT" se refiere a los niveles de activación o fosforilación de AKT global en la muestra que son superiores a un valor inicial. En un ejemplo, el valor inicial es los niveles basales de pAKT para un tipo dado de célula. En otro ejemplo, el valor inicial es el nivel promedio o medio de pAKT en una población dada de células de muestra. En otro ejemplo, un "perfil alto de pAKT" se refiere a una célula tumoral que se expresa en exceso o tiene AKT fosforilada o activada amplificada en la célula, cuando se compara con un promedio de células normales sanas (por ejemplo, no tumorales) del mismo tipo que o el mismo mamífero o una población de pacientes. Se muestra un ejemplo en la Figura 9 que demuestra que un perfil alto de pAKT predice la sensibilidad a inhibidores de AKT, por ejemplo GDC-0068. El perfil de pAKT también se puede usar conjuntamente con otros marcadores (por ejemplo, pérdida de PTEN, mutaciones en cinasas PI3K, Kras o Braf, o perfiles de localización de FOXO3) para predecir la eficacia de ciertos inhibidores de AKT.

Se conocen en la técnica métodos de medición de los niveles de activación de AKT y las cantidades de pAKT en una muestra. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de inmunoprecipitación, tales como el kit del ensayo de actividad de AKT (disponible de Abcam®, San Francisco, CA). En otro ejemplo, se pueden usar ensayos de transferencia Western, tales como el kit de ensayo de transferencia Western de AKT (disponible de Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Otros formatos de ensayo conocidos para medir los niveles de pAKT incluyen ensayos inmunosorbentes asociados a quimioluminiscencia, véase Cícenas, J, et al., "Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2", *Breast Can. Res.*, 7(4), R394, 2005. Están disponibles otros ensayos que pueden usar, por ejemplo, el kit de ensayo AlphaScreen SureFire Akt 1 (p-Thr308) (disponible de Perkin Elmer, Waltham, MA).

Se conocen en la técnica métodos de determinación de la presencia de mutaciones de PI3K. Por ejemplo, se conocen ensayos para la detección de mutaciones específicas en el gen PIK3CA (en los exones 9 y 20, y también mutaciones H1047R o H1047L), usando PCR en tiempo real (disponible de Qiagen, Valencia, CA).

Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ARN transcrito de ADN genómico, o ADNc generado de ARN. Un ácido nucleico se puede obtener de un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Un ácido nucleico se dice que se "obtiene" de una fuente particular si se obtiene directamente de esa fuente o si es una copia de un ácido nucleico encontrado en esa.

Se pueden detectar variaciones en ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos por ciertos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, secuenciación de ADN; ensayos de extensión de cebadores, que incluyen ensayos de incorporación de nucleótidos específicos de alelo y ensayos de extensión cebadores específicos de alelo (por ejemplo, PCR específica de alelo, reacción en cadena de la ligasa específica de alelo (LCR) y LCR de hueco); ensayos de hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo (por ejemplo, ensayos de unión de oligonucleótidos); ensayos de protección de la escisión en los que la protección de los agentes de escisión se usa para detectar bases desapareadas en dúplex de ácido nucleico; análisis de la unión de la proteína MutS; análisis electroforético que compara la movilidad de moléculas de variante y no mutantes de ácidos nucleicos; electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE, como en, por ejemplo, Myers et al. (1985) *Nature* 313:495); análisis de escisión de RNasa en pares de bases desapareadas; análisis de la escisión química o enzimática de ADN de heterodúplex; espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF); análisis de bits genéticos (GBA); ensayos de nucleasa en 5' (por ejemplo, TaqMan®); y ensayos empleando balizas moleculares. Ciertos de estos métodos se tratan con más detalle a continuación.

La detección de variaciones en ácidos nucleicos diana se puede llevar a cabo por clonación molecular y secuenciación de los ácidos nucleicos diana usando técnicas bien conocidas en la técnica. Alternativamente, se pueden usar técnicas de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias de ácidos nucleicos diana directamente a partir de una preparación de ADN genómico de tejido tumoral. Entonces se puede determinar la secuencia de ácidos nucleicos de las secuencias amplificadas y las variaciones identificadas de las mismas. Se conocen bien en la técnica las técnicas de amplificación, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa se describe en Saiki et al., *Science* 239:487, 1988; las patentes de EE.UU. N° 4.683.203 y 4.683.195.

La reacción en cadena de la ligasa, que se conoce en la técnica, también se puede usar para amplificar secuencias de ácidos nucleicos diana. Véase, por ejemplo, Wu et al., *Genomics* 4:560-569 (1989). Además, también se puede usar una técnica conocida como PCR específica de alelo para detectar variaciones (por ejemplo, sustituciones). Véase, por ejemplo, Ruano y Kidd (1989) *Nucleic Acids Research* 17:8392; McClay et al. (2002) *Analytical Biochem.* 301:200-206. En ciertas realizaciones de esta técnica, se usa un cebador específico de alelo en donde el nucleótido del extremo 3' del cebador es complementario a (es decir, capaz de emparejar específicamente bases con) una variación particular en el ácido nucleico diana. Si la variación particular no está presente, no se observa un producto de amplificación. También se puede usar el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) para detectar

variaciones (por ejemplo, sustituciones). Se describe ARMS, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente europea N° 0332435, y en Newton et al., *Nucleic Acids Research*, 17:7, 1989.

Otros métodos útiles de detección de variaciones (por ejemplo, sustituciones) incluyen, pero no se limitan a, (1) ensayos de incorporación de nucleótidos específicos de alelo, tales como ensayos de extensión de bases individuales (véanse, por ejemplo, Chen et al. (2000) *Genome Res.* 10:549-557; Fan et al. (2000) *Genome Res.* 10:853-860; Pastinen et al. (1997) *Genome Res.* 7:606-614; y Ye et al. (2001) *Hum. Mut.* 17:305-316); (2) ensayos de extensión de cebadores específicos de alelo (véanse, por ejemplo, Ye et al. (2001) *Hum. Mut.* 17:305-316; y Shen et al. *Genetic Engineering News*, vol. 23, 15 de marzo de 2003), que incluye PCR específica de alelo; (3) ensayos de nucleasa en 5' (véanse, por ejemplo, De La Vega et al. (2002) *BioTechniques* 32:S48-S54 (que describe el ensayo TaqMan®); Ranade et al. (2001) *Genoma Res.* 11:1262-1268; y Shi (2001) *Clin. Chem.* 47:164-172); (4) ensayos que emplean balizas moleculares (véanse, por ejemplo, Tyagi et al. (1998) *Nature Biotech.* 16:49-53; y Mhlanga et al. (2001) *Methods* 25:463-71); y (5) ensayos de unión de oligonucleótidos (véanse, por ejemplo, Grossman et al. (1994) *Nuc. Acids Res.* 22:4527-4534; publicación de solicitud de patente N° US 2003/0119004 A1; publicación internacional PCT N° WO 01/92579 A2; y la patente de EE.UU. N° 6.027.889).

También se pueden detectar variaciones por métodos de detección de desapareamientos. Los desapareamientos son dúplex de ácido nucleico hibridados que no son 100 % complementarios. La falta de complementariedad total puede ser debida a deleciones, inserciones, inversiones, o sustituciones. Un ejemplo de un método de detección de desapareamientos es el ensayo de detección de la reparación de desapareamientos (MRD) descrito, por ejemplo, en Faham et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:14717-14722 (2005) y Faham et al., *Hum. Mol. Genet.* 10:1657-1664 (2001). Otro ejemplo de una técnica de escisión de desapareamientos es el método de protección de RNasa, que se describe con detalle en Winter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:7575, 1985, y Myers et al., *Science* 230:1242, 1985. Por ejemplo, un método de la invención puede implicar el uso de una ribosonda marcada que es complementaria al ácido nucleico diana no mutante humano. Se aparean juntos (hibridan) la ribosonda y el ácido nucleico diana derivado de la muestra de tejido y posteriormente se digieren con la enzima RNasa A que es capaz de detectar algunos desapareamientos en una estructura de ARN de dúplex. Si se detecta un desapareamiento por RNasa A, se escinde en el sitio del desapareamiento. Así, cuando se separa la preparación de ARN hibridada sobre una matriz de gel electroforético, si se ha detectado un desapareamiento y escindido por RNasa A, se observará un producto de ARN que es más pequeño que el ARN de dúplex de longitud completa para la ribosonda y el ARNm o ADN. La ribosonda no necesita ser la longitud completa del ácido nucleico diana, sino que puede ser una porción del ácido nucleico diana, siempre que englobe la posición que se sospecha que tiene una variación.

De una manera similar, se pueden usar sondas de ADN para detectar desapareamientos, por ejemplo, mediante escisión enzimática o química. Véase, por ejemplo, Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4397, 1988; y Shenk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:989, 1975. Alternativamente, se pueden detectar desapareamientos por desplazamientos en la movilidad electroforética de dúplex desapareados con respecto a dúplex apareados. Véase, por ejemplo, Cariello, *Human Genetics*, 42:726, 1988. Con o ribosondas o sondas de ADN, se puede amplificar antes de la hibridación el ácido nucleico diana que se sospecha que comprende una variación. Los cambios en el ácido nucleico diana también se pueden detectar usando hibridación Southern, especialmente si los cambios son transposiciones macroscópicas, tales como deleciones e inserciones.

Se pueden usar sondas de polimorfismos en la longitud del fragmento de restricción (RFLP) para el ácido nucleico diana o genes marcadores de alrededor para detectar variaciones, por ejemplo, inserciones o deleciones. También se pueden detectar inserciones y deleciones por clonación, secuenciación y amplificación de un ácido nucleico diana. También se puede usar el análisis de polimorfismos de conformación monocatenaria (SSCP) para detectar variantes de cambio de base de un alelo. Véase, por ejemplo, Orita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770, 1989, y *Genomics*, 5:874-879, 1989.

La invención también proporciona una variedad de composiciones adecuadas para su uso en realizar métodos de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona matrices que se pueden usar en dichos métodos. En una realización, una matriz de la invención comprende colecciones individuales o de moléculas de ácidos nucleicos útiles para detectar variaciones. Por ejemplo, una matriz de la invención puede comprender una serie de oligonucleótidos específicos de alelo individuales discretamente dispuestos o conjuntos de oligonucleótidos específicos de alelo. Se conocen bien en la técnica varias técnicas para unir ácidos nucleicos a un sustrato sólido tal como un portaobjetos de vidrio. Es un método incorporar bases o análogos modificados que contienen un resto reactivo que es capaz de unión a un sustrato sólido, tal como un grupo amina, un derivado de un grupo amina, u otro grupo con una carga positiva, en moléculas de ácidos nucleicos que se sintetizan. El producto sintetizado se pone entonces en contacto con un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio recubierto con un aldehído u otro grupo reactivo. El aldehído u otro grupo reactivo formará un enlace covalente con el resto reactivo sobre el producto amplificado, que se unirá covalentemente al portaobjetos de vidrio. También se conocen en la técnica otros métodos, tales como los que usan química de superficies de aminopropilsilíce.

Se puede obtener una muestra biológica, según cualquiera de los métodos anteriores, usando ciertos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden obtener muestras biológicas de animales vertebrados, y en particular, mamíferos. La biopsia de tejido se usa frecuentemente para obtener un trozo representativo de tejido

tumoral. Alternativamente, se pueden obtener indirectamente células tumorales en forma de tejidos o fluidos que se conocen o se cree que contienen las células tumorales de interés. Por ejemplo, se pueden obtener muestras de lesiones de cáncer de pulmón por resección, broncoscopia, aspiración con aguja fina, cepillados bronquiales, o de esputo, líquido de la pleura o sangre. Se pueden detectar variaciones en ácidos nucleicos diana (o polipéptidos codificados) de una muestra tumoral o de otras muestras corporales tales como orina, esputo o suero. Las células cancerosas son exfoliadas de tumores y aparecen en dichas muestras del cuerpo. Cribando dichas muestras del cuerpo, se puede lograr un simple diagnóstico precoz para enfermedades tales como cáncer. Además, se puede monitorizar más fácilmente el progreso de la terapia probando dichas muestras del cuerpo para variaciones en ácidos nucleicos diana (o polipéptidos codificados). Además, se conocen en la técnica métodos de enriquecimiento de una preparación de tejido para células tumorales. Por ejemplo, el tejido se puede aislar de parafina o secciones de criostato. También se pueden separar células cancerosas de células normales por citometría de flujo o microdissección por captura láser.

Inhibidores de cinasas AKT

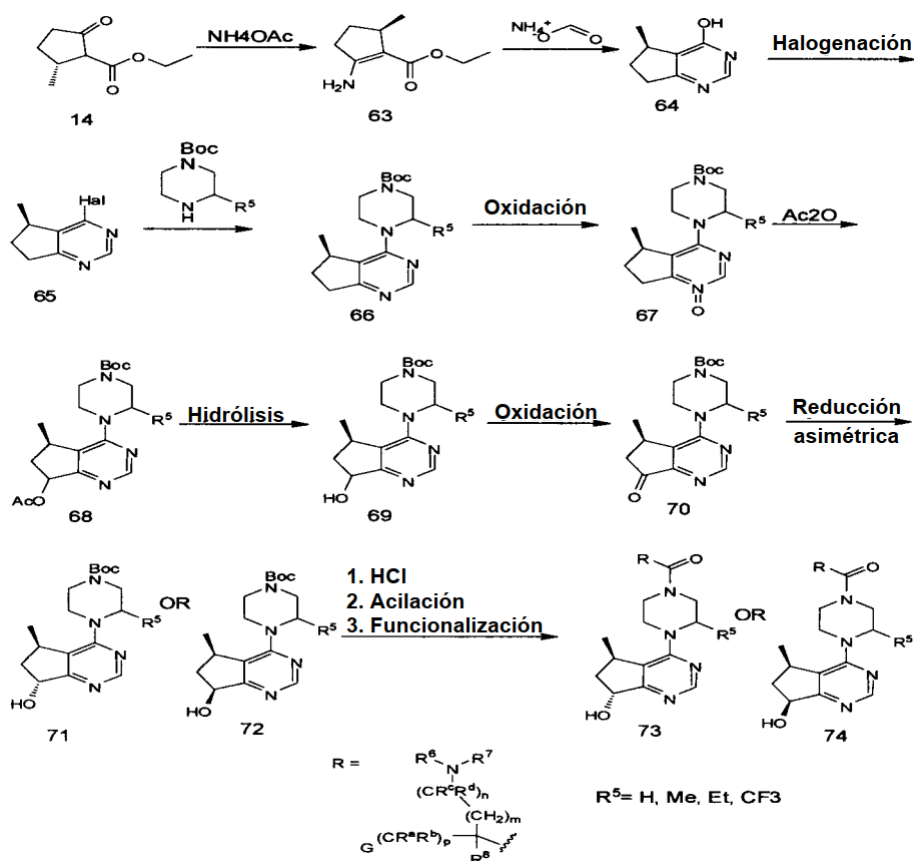
Se conocen ciertos inhibidores de cinasas AKT como inhibidores competitivos de ATP, para su capacidad para competir con ATP para unirse al sitio activo de AKT. Ciertos inhibidores de cinasas AKT conocidos como inhibidores alostéricos no se unen al sitio activo de AKT. Por tanto, los inhibidores de cinasas AKT pueden ser inhibidores de pan-AKT, en donde el inhibidor puede inhibir la actividad de dos o más de AKT-1, AKT-2 y AKT-3. Los inhibidores de cinasas AKT pueden ser inhibidores de AKT selectivos, en donde el inhibidor puede inhibir la actividad de uno de AKT-1, AKT-2 y AKT-3, sin inhibir la actividad de los otros dos.

En una realización, el inhibidor de cinasas AKT es (S)-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilamino)propan-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Preparación de compuesto

El compuesto de la presente invención se puede preparar según métodos descritos en la publicación de patente de EE.UU. Nº 2008/0051399 (solicitud de patente de EE.UU. Nº de serie 11/773.949, presentada el 5 de julio de 2007, titulada "Hydroxylated and Methoxylated Pyrimidyl Cyclopentanes as AKT Protein Kinase Inhibitors").

Para fines ilustrativos, el Esquema 3 muestra un método de preparación general del compuesto. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar otras rutas de síntesis. Aunque se representan materiales de partida y reactivos específicos en el esquema y se tratan a continuación, otros materiales de partida y reactivos pueden ser fácilmente sustituidos para proporcionar una variedad de derivados y/o condiciones de reacción.



El Esquema 3 muestra un método de preparación de los compuestos 73 y 74. Según el Esquema 3, la aminación de 14 usando un síntón de amoniaco da 63. La formación de pirimidina usando, por ejemplo, formiato de amonio en presencia de formamida a 50 °C-250 °C y/o a alta presión da la unidad bicíclica 64. La activación de 64 usando, por ejemplo, POCl₃ o SOCl₂ da la pirimidina activada 65. El desplazamiento de este grupo saliente, usando una piperidina protegida/sustituída adecuada a 0 °C a 150 °C da la piperidina 66. La oxidación, usando, por ejemplo, ácido m-cloroperoxibenzoico ("MCPBA" o "mCPBA") u Oxone® a -20 °C a 50 °C da el N-óxido 67. El tratamiento con un agente acilante (por ejemplo, anhídrido acético) seguido por calentamiento (40 °C a 200 °C) provoca la reordenación dando 68. La hidrólisis, usando, por ejemplo LiOH o NaOH a 0 °C a 50 °C da el alcohol 69. La oxidación, usando por ejemplo, condiciones de Swern, MnO₄ o complejo de piridina-SO₃ a temperaturas apropiadas da la cetona 70. La reducción asimétrica usando, por ejemplo, un catalizador quiral catalítico en presencia de hidrógeno, el catalizador CBS o un agente reductor de borohidruro en presencia de un ligando quiral da lugar a o la estereoquímica (R) o (S) en el alcohol 71 o 72. Alternativamente, se podría usar un agente reductor no quiral (por ejemplo, H₂, Pd/C), que permite que el grupo metilo sobre la unidad de ciclopentano proporcione selectividad facial y, por último lugar, diastereoselectividad. Si la reducción da una diastereoselectividad más baja, los diastereómeros se podrían separar por (por ejemplo) cromatografía, cristalización o derivatización. Finalmente, la desprotección del grupo Boc, usando, por ejemplo, ácido a 0 °C a 50 °C, acilación usando un aminoácido apropiadamente funcionalizado y funcionalización final de la amina de este aminoácido (por ejemplo, retirada de cualquier grupo protector, alquilación, aminación reductora o acilación para introducir nuevos sustituyentes) da lugar a los compuestos finales 73 y 74.

Ciertas realizaciones de la invención se ilustrarán ahora por los siguientes ejemplos no limitantes.

Mutaciones activantes en AKT1

Los solicitantes han descubierto que ciertas mutaciones en *AKT1* pueden conducir a interacciones alteradas entre el dominio PH y el dominio cinasa de AKT1. Una alteración entre estos dominios, provocada por la(s) mutación (mutaciones), parece conducir a una fosforilación constitutiva de AKT1 y a señalización constitutiva de AKT1. Estos efectos también permiten la transformación de células. Estas mutaciones confieren resistencia a inhibidores alostéricos de PI3K y Akt. Por consiguiente, la presencia de dichas mutaciones indica que la dosificación eficaz para inhibidores alostéricos de PI3K y Akt será más alta, y también indica que se deben usar inhibidores distintos de inhibidores alostéricos de PI3K y/o Akt, tales como inhibidores de Akt competitivos.

AKT, y las interacciones del dominio PH y cinasa, se representan en la Figura 1A y 1B. Los solicitantes también presentan las localizaciones de las interacciones entre el dominio PH y cinasa en la Figura 1C.

Los resultados que indican que las mutaciones sintéticas en sitios que se cree que alteran las interacciones del dominio PH con el dominio cinasa conducen a fosforilación constitutiva de Akt se muestran en la Figura 2.

Las mutaciones somáticas encontradas en pacientes con cáncer se muestran en la Figura 3.

Los solicitantes han encontrado que las mutaciones somáticas conducen a fosforilación constitutiva de Akt y también conducen a señalización constitutiva de Akt (véase la Figura 4).

Los solicitantes también han demostrado que los mutantes de Aktl pueden transformar células (véase la Figura 5).

De forma interesante, los mutantes de Aktl confieren resistencia a inhibidores de PI3K y a inhibidores alostéricos de AKT. Será beneficioso este descubrimiento de un biomarcador que indica qué pautas de tratamiento serían más beneficiosas para un paciente que tiene dicho biomarcador. Por consiguiente, estas mutaciones son importantes para el diagnóstico del cáncer y para determinar el apropiado tratamiento terapéutico.

Además, las mutaciones Akt también afectan la localización de la membrana de Akt, con translocación mínima a la membrana plasmática.

Mutaciones que conducen a la activación constitutiva de AKT

La proteína cinasa AKT, un regulador clave de la supervivencia celular y proliferación, se hiperactiva frecuentemente en cánceres humanos. Las interacciones intramoleculares dominio de homología de pleckstrina (PH) - dominio cinasa (KD) son importantes en el mantenimiento de AKT en un estado inactivo. La activación de AKT avanza siguiendo un cambio conformacional que quita PH del dominio cinasa. Para entender estas interacciones autoinhibidoras, se generaron mutaciones en la interfase PH-KD, y se encontró que la mayoría de ellas conducen a la activación constitutiva de AKT. Dichas mutaciones son probablemente otro mecanismo por el que la activación puede ocurrir en cánceres humanos y otras enfermedades. En soporte de esto, se encontraron mutaciones somáticas en *AKT1* en la interfase PH-KD que no habían sido previamente descritas en cánceres humanos. Además, los mutantes somáticos *AKT1* son constitutivamente activos, que conducen a señalización oncogénica. Además, los mutantes *AKT1* no son eficazmente inhibidos por inhibidores de AKT alostéricos, de acuerdo con la necesidad de una interfase PH-KD intacta para inhibición alostérica. Estos resultados tienen importantes implicaciones para intervención terapéutica en pacientes con mutaciones de AKT en la interfase PH-KD.

En este estudio, se realizó un análisis sistemático para entender los efectos de perturbar las interacciones PH-KD tras la activación de AKT. La alteración de los contactos entre dominios mutando restos en la interfase PH-KD conduce a la activación de AKT. Dado esto, se secuenció un gran número de tumores humanos para ver si las mutaciones en los sitios de contacto PH-KD ocurrían en cánceres. De forma interesante, se encontró que los tumores humanos que llevan mutaciones en *AKT* en estos sitios, que indican alteración de las interacciones PH-KD, es un mecanismo importante para la activación de AKT en cánceres. Estas mutaciones somáticas específicas de tumor se probaron para actividad y se ha mostrado que son oncogénicas. Por tanto, se probaron inhibidores de AKT contra estos mutantes, y los inhibidores competitivos de ATP son más eficaces en comparación con los inhibidores de AKT alostéricos.

La perturbación de los contactos del dominio PH-cinasa conducen a activación de AKT

Para evaluar el estado de activación de AKT, se desarrolló un ensayo que midió la capacidad de AKT para promover la supervivencia independiente del factor de crecimiento de células BaF3 dependientes de IL-3. Los pro-linfocitos B de BaF3 se pueden volver independientes del factor de crecimiento por la expresión forzada de oncogenes. Se generaron células BaF3 que expresan AKT1 no mutante (WT AKT1), miristoilado (Myr) o el mutante E17K AKT1 y se encontró que AKT activada por sí misma era incapaz de promover la independencia del factor. Sin embargo, la co-expresión de Myr AKT1 o E17K AKT1 oncogénico y una forma activada de la MAP2 cinasa MEK1 (Mek1 Δ N3, S218E, S222D) promovió el crecimiento independiente de factor y la supervivencia de células BaF3. Aunque WT AKT1 en combinación con MEK1 activo (MEK1 N3) mostró cierta actividad en este ensayo, fue menos eficaz en comparación con AKT1 mutante.

Se usó el ensayo de BaF3 para investigar la consecuencia de alterar las interacciones de PH-KD. Usando la estructura de longitud completa recientemente publicada de AKT1 (Wu et al., (2010). PLoS One 5, e12913), se identificaron los restos en la interfase PH-KD. Se diseñaron mutaciones en estos sitios para comprometer la interacción PH-KD por retirada de interacciones favorables, aumentando la masa estérica o invirtiendo la carga de las cadenas laterales implicadas en contactos polares entre dominios. Se generó una biblioteca de 35 de dichos mutantes de *AKT1* (Figura 16; Tabla 1). También se incluyeron en el conjunto una construcción de mutantes AKT1 E17K que sirvió de control positivo y un clon WT AKT1 con una mutación silenciosa que sirvió de control negativo para actividad. Se usaron tres bibliotecas de mutantes de AKT para derivar un conjunto de células BaF3 que

coexpresaron establemente los mutantes junto con MEK1 N3. Después de permitir el crecimiento en ausencia de IL-3, se muestreó el conjunto de células 3 días y 4 días después de la retirada de IL-3 y la proporción de diversos mutantes en el conjunto determinado con respecto a la entrada en 0 horas, usando secuenciación de próxima generación (Figura 16C). Cada mutación se puntuó basándose en una relación normalizada de frecuencia observada en un punto de tiempo dado en comparación con la frecuencia de entrada y estas relaciones se normalizaron entonces a las relaciones para WT AKT1. Como era de esperar, AKT1 E17K estuvo más de 50 veces enriquecido con respecto al mutante. Similarmente, mutantes tales como T81Y y D323A también estuvieron fuertemente enriquecidos (> 15 veces con respecto a WT), que indica que estas mutaciones conducen a la activación de AKT. Otros mutantes, R23A, N53A, F55Y, L78T, Q79E, W80A, E191A, T195I, V270A, V271A, L321A, D325A y R328A mostraron enriquecimiento moderado (2-6 veces con respecto a WT en cualquiera momento de tiempo de 3 días o 4 días) en el ensayo, y es probable que se activen (Figura 16D, Tabla 1).

Tabla 1 - Sumario de mutaciones AKT1 PH-KD y sus efectos

Mutación AKT1	Localización del resto	Estado de activación (pT308/pS473 en NIH3T3)	Ensayo de supervivencia de BaF3	Interacciones clave entre dominios en WT
WT (L52L)	control negativo	-	-	n/a
Myr (K189K)	control positivo	+	+	n/a
E17K	control positivo	nd	+	próximo al sitio D323
m	contacto entre dominios*	+	-	contacto polar con D323
G16A	borde interfacial	+	-	próximo al sitio D323
Y18S	contacto entre dominios*	+	-	contactos polares e hidrófobos con R273, K297, V320 y Y326
I19E	contacto entre dominios*	+	-	contactos hidrófobos con L321 y F358
R23A	contacto entre dominios*	-	+	contacto polar con D323
L52A	contacto entre dominios*	+	-	contactos hidrófobos con V270, V271 y Y326
N53A	borde interfacial	+	+	próximo a N269 y V270
N54A	contacto entre dominios*	+	-	enlaces de hidrógeno con agua interfacial; próximo a V271 y Y326
F55Y	contacto entre dominios*	+	+	contactos hidrófobos con Y326
Q59E	borde interfacial	-	-	probablemente próximo al bucle 188-198
L78T	contacto entre dominios*	+	+	contactos hidrófobos con L181, L223 y F225
Q79E	borde interfacial	+	+	próximo al sitio del inhibidor alostérico
W80A	contacto entre dominios*	+	+	contactos hidrófobos con V201 y L213
T81Y	contacto entre dominios*	+	+	contacto hidrófobo con F225; HB con D292
V83D	contacto entre dominios*	+	+	contacto hidrófobo con F161, L181 y I186
E114A	borde interfacial	+	-	conector PH-KD de parte (bucle no definido en la estructura)
E191A	borde interfacial	+	-	parte del bucle 188-198 en KD ausente en la estructura
T195I	borde interfacial	+	+	parte del bucle 188-198 en KD ausente en la estructura
L196R	interface centro	+	-	parte del bucle 188-198 en KD ausente en la estructura

(continuación)

Mutación AKT1	Localización del resto	Estado de activación (pT308/pS473 en NIH3T3)	Ensayo de supervivencia de BaF3	Interacciones clave entre dominios en WT
R200A	borde interfacial	+	-	próximo a W80
L202F	contacto entre dominios*	+	-	contacto hidrófobo con W80
V270A	contacto entre dominios*	nd	+	contactos hidrófobos con L52 y N53
V271A	contacto entre dominios*	nd	+	contactos hidrófobos con L52
L316A	contacto entre dominios*	+	-	contacto hidrófobo con Y18
V320A	contacto entre dominios*	+	+	contacto hidrófobo con Y18
L321A	contacto entre dominios*	+	+	contacto hidrófobo con Y18
D323A	contacto entre dominios*	+	+	contacto polar con K14, R23 y R25
N324K	contacto entre dominios*	+	+	contacto de hidrógeno enlace con R25
D325A	borde interfacial	+	+	enlace de hidrógeno con K39 bb y agua interfacial
Y326A	contacto entre dominios*	+	+	contacto hidrófobo con F55
R328A	borde interfacial	+	+	próximo a L52
E355A	borde interfacial	+	-	próximo a I19
F358S	contacto entre dominios*	+	-	contacto hidrófobo con I19
L362R	borde interfacial	+	-	próximo a sitio I19
* Restos identificados como contactos entre dominios de la estructura cristalina de AKT1 (Wu et al, Plos One, 2010; código de acceso PDB 3096) nd = no determinado				

Para entender además el efecto de los mutantes de la interfase PH-KD, se generaron líneas celulares NIH3T3 que expresaban establemente cada uno de los mutantes *AKT1* y se evaluó el estado de fosforilación T308 y S473 (pT308 y pS473). De acuerdo con el cribado del ensayo de supervivencia, los mutantes N53A, F55Y, L78T, Q79E, W80A, T81Y, E191A, T195I, L321A, D323A, D325A y R328A mostraron fosforilación aumentada sobre T308 y S473 (Figura 16E). Además, aunque los mutantes de *AKT1* N54A, V83D, E114A, L202F, V320A, N324K y Y326A solo mostraron un leve enriquecimiento (~1,5-2 veces con respecto a WT) en el cribado de la supervivencia, mostraron niveles elevados de pT308 y pS473. Estos resultados indican que alterar los contactos PH-KD conduce a fosforilación constitutiva de AKT.

Identificación de mutaciones somáticas de AKT en cáncer

Dado que la perturbación de la interfase PH-KD condujo a la activación de AKT, se evaluó si dichas mutaciones ocurrían en tumores primarios humanos. Para identificar posibles mutaciones de *AKT*, se secuenciaron todos los exones de *AKT1*, 2 y 3 en un total de 394 muestras de tumores primarios humanos que consistían en 65 de colorrectal, 51 de mama, 48 de adenocarcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) (adeno), 43 de NSCLC (escamoso), 43 de carcinoma renal, 37 de melanoma, 33 de gástrico, 32 de ovario, 15 de esófago, 11 de hepatocelular (HCC), 10 de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y 6 otros (5 de células grandes de pulmón y 1 cáncer de pulmón más). Se encontraron mutaciones *AKT1* somáticas que alteran la proteína en 4 % de mama (2/51) y 1,5 % de colon (1/65). Se encontraron mutaciones somáticas *AKT2* en ~5 % de NSCLC (adeno; 2/43) (Figura 17).

Además de la mutación E17K, también hay una mutación *AKT1* en el codón 52, L52R. L52 está en la interfase PH-KD y hace contactos hidrófobos con V270, V271, Y326 y la porción de metileno de R328 en el dominio cinasa. Aunque la mutación L52A incrementó el nivel de fosforilación de *AKT1* en comparación con WT, no condujo a un aumento en la supervivencia en el ensayo de BaF3. Sin embargo, es probable que la mutación L52R sea perjudicial para las interacciones PH-KD (y, por tanto, promueva la actividad de *AKT1*) puesto que se perderán las interacciones hidrófobas favorables y se introducirá una interacción desfavorable con R328. Similarmente, la mutación D323H identificada en tumor de mama se localiza en el dominio cinasa de *AKT1* y es proximal a tres restos básicos en el dominio PH (K14, R23 y R25) (Figura 1B, 2B). El mutante sintético D323A era constitutivamente activo, sugiriendo que D323H también sería constitutivamente activo puesto que una histidina es incluso más perjudicial para el contacto entre dominios que la alanina (elevado volumen estérico; posibilidades de inversión de carga). El

resto R96 se localiza en la hélice principal del dominio PH y está alejado de la interfase del dominio cinasa y, por tanto, es poco probable que promueva la activación mediante la alteración de interacciones PH-KD. No se observa densidad electrónica para los restos K189 a E198 en la estructura cristalina de AKT1 de longitud completa. Aunque este bucle del dominio cinasa es probablemente proximal al extremo C de la hélice del dominio PH, no es posible una estimación basada en estructura de los cambios en la actividad de AKT1 asociados a la mutación K189N.

Tabla 2: Proteína de la familia AKT que altera mutaciones en cánceres humanos

Gen	Tumor	Mutaciones (cambio de aminoácidos)
AKT1	Cáncer de mama	E17K
AKT1	NSCLC (Adeno)	F35L, E17K
AKT1	Cáncer de mama (HR+)	L52R, E17K
AKT1	Melanoma	E17K
AKT1	Cáncer endometrial	E17K
AKT1	Próstata	E17K
AKT1	Cáncer de vejiga (líneas tumorales y celulares)	E17K
AKT1	Cáncer de vejiga (línea celular)	E49K
AKT2	Cáncer de colon	S302G, R371H
AKT3	NSCLC (Adeno)	Q124L,
AKT3	Glioma	G171R
AKT3	Leucemia (CLL)	K172Q
AKT3	Melanoma (tumor y líneas celulares)	E17K

Los mutantes somáticos de AKT1 señalizan constitutivamente y conducen a transformación

Para evaluar la relevancia funcional de las mutaciones somáticas de AKT1, se probaron los mutantes L52R y D323H que se predice que afectan las interacciones PH-KD. Además, se probó la mutación K189N que ocurre en el dominio cinasa. Se probaron estos mutantes para su efecto sobre la señalización, usando células NIH3T3 que expresan establemente AKT1 WT marcado con FLAG en el extremo N, AKT1 miristoilado (Myr AKT1), o los mutantes E17K, L52R, K189N y D323H. El análisis de inmunotransferencia mostró que a diferencia del vector transducido o las células AKT1 WT, todos los mutantes, excepto K189N, mostraron un aumento en tanto pT308 como pS473, similar a Myr AKT1. De acuerdo con esto, los presentes inventores observaron un aumento concomitante en la fosforilación de los sustratos de AKT FOXO y la proteína ribosómica S6 en células que expresan Myr o AKT1 mutante en comparación con células que expresan vector vacío, WT AKT1, o el mutante K189N AKT1. De forma interesante, a diferencia de Myr AKT o el mutante L52R, la expresión de E17K o D323H no dio como resultado la fosforilación aumentada del sustrato AKT PRAS40, sugiriendo que estos mutantes pueden participar en diferentes vías efectoras aguas abajo.

Los mutantes del dominio PH-cinasa de AKT1 debilitan las interacciones entre dominios y muestran translocación alterada de la membrana plasmática

Aunque las mutaciones de AKT1 específicas de cáncer, L52R y D323H, ocurren en las posiciones predichas por alterar las interacciones PH-KD, las sustituciones de aminoácidos observadas fueron diferentes de los mutantes sintéticos generados y analizados anteriormente. Para probar directamente si estas mutaciones somáticas debilitaban las interacciones entre dominios, se realizó un ensayo de 2 híbridos de mamífero usando construcciones PH y KD de AKT fusionadas con el dominio de activación de VP16 (VP16 AD) y dominio de unión de ADN de Gal4 (Gal4 DBD), respectivamente. Se midió la intensidad de la interacción usando un indicador de luciferasa donde la actividad de luciferasa es proporcional a la intensidad de la interacción. La combinación dominio PH de L52R/WT-KD y WT-PH/D323H KD mostró una reducción de 50 % en la señal de interacción en comparación con WT-PH/WT-KD o E17K-PH/WT-KD, confirmando que los mutantes L52R y D323H son deficientes en la interacción PH-KD.

Para entender además el mecanismo de activación de mutantes de AKT, se determinó su localización celular. En células en reposo, AKT1 mutante se localiza difusamente a través del citoplasma y núcleo y en respuesta a estimulación mitogénica se transloca rápidamente a la membrana plasmática, que conduce a su activación.

Se probó el mutante L52R del dominio PH para la localización subcelular y la translocación de membrana usando una construcción de fusión de dominios PH de GFP-AKT1. Las construcciones de fusión de GFP de dominios PH de AKT1 WT y E17K sirvieron de controles. En ausencia de estimulación del factor de crecimiento, mientras que el dominio PH AKT1 WT se distribuyó por todo el citoplasma y el núcleo, el dominio PH de AKT1 E17K se localizó constitutivamente en la membrana plasmática. A diferencia del dominio PH de AKT1 E17K, el dominio PH de AKT1 L52R se distribuyó por todo el citoplasma y el núcleo, comportándose como el dominio PH de AKT1WT. Sin embargo, tras la estimulación del factor de crecimiento, a diferencia del dominio PH de AKT1 WT, el dominio PH de L52R mutante no se translocó a la membrana plasmática. Esto sugiere que a diferencia del mutante E17K que se activa en respuesta a la afinidad de lípidos alterados y localización, el mutante L52R se activa lo más probablemente en el citoplasma, debido a la ausencia de interacciones autoinhibidoras.

La alteración de las interacciones PH-KD de AKT2 y AKT3 conducen a su activación

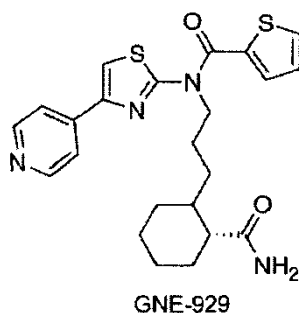
Dada la arquitectura de dominio común de los miembros de la familia de AKT, se probó si alterar las interacciones PH-KD en AKT2 y AKT3 podía conducir a su activación. Para probar esto, se generaron los mutantes de AKT2 L52R y D324H y los mutantes de AKT3 L51R y D320H (equivalentes de AKT1 L52R y D323H), todos los cuales se predice que alteran la interacción PH-KD. Puesto que las mutaciones E17K de AKT3 se pueden encontrar en melanoma, y se ha informado de la mutación E17K de AKT2 en hipoglucemia humana, se generaron los mutantes E17K de AKT2 y AKT3, junto con mutaciones somáticas de AKT2 y AKT3 adicionales que se han identificado en cánceres humanos. Además, se generaron Myr AKT2 y Myr AKT3 como controles positivos. Se expresaron establemente los mutantes AKT2 y AKT3 en células NIH3T3 y se evaluó el estado de fosforilación de T308 y S473. AKT2 E17K, L52R y D324H, y AKT3 E17K, L51R y D320H mostraron todos pT308 y pS473 elevados en comparación con las células que expresan AKT2 o AKT3 WT. De acuerdo con el estado de activación, estos mutantes de AKT2 y AKT3 fueron capaces de soportar la supervivencia independiente del factor de crecimiento de células BaF3 en combinación con MEK1 activado. De forma interesante, el mutante de AKT2 R371H identificado en cáncer humano también mostró pT308 y pS473 elevados, pero no fue capaz de promover la supervivencia del factor de crecimiento independiente de BaF3. Los restantes mutantes (AKT2 V90L y R101L y AKT3 Q124L y G171R) no mostraron un aumento en pT308 y pS473 y no fueron capaces de soportar la supervivencia independiente del factor de crecimiento de células BaF3. La inspección de los modelos de homología generados para AKT2 y AKT3 de longitud completa indican que estas mutaciones ocurren todas en bucles expuestos a la superficie y no son proximales a la interfase PH-KD. Obsérvese que aún cuando AKT2 V90L y AKT3 Q124L están en bucles no definidos en la densidad electrónica de AKT1, los extremos de estos bucles no son proximales a la interfase PH-KD. Así, el análisis estructural no ofrece ningún entendimiento sobre cómo AKT2 R371H es capaz de elevar la fosforilación, o cómo cualquiera de estos mutantes podría ser una fuerza impulsora para los cánceres en los que se identificaron.

Mutantes somáticos de AKT1 promueven la oncogénesis *in vivo*

Estudios previos han mostrado que las células BaF3 que expresan establemente oncogenes, cuando se implantan en ratones, promueven una enfermedad de tipo leucemia, que conduce a una reducción en la supervivencia global. Puesto que los mutantes de AKT1 cooperan con MEK1 activos para promover el crecimiento independiente de factor de células BaF3, se usó este sistema modelo para probar su potencial tumorigénico *in vivo*. Los ratones implantados con células BaF3 que coexpresan MEK1 N3 y Myr AKT1 o el mutante AKT1 E17K, L52R o D323H, mostraron una mediana de la supervivencia de 19 a 20,5 días. A diferencia, los ratones que recibieron células BaF3 que coexpresan MEK1 N3 y AKT1 WT tienen una mediana de la supervivencia significativamente más larga de 29 días. Esto está de acuerdo con el hecho de que AKT1 WT en el contexto de MEK1 activo fue capaz de soportar la supervivencia independiente del factor de células BaF3, aunque el efecto era modesto en comparación con los mutantes de AKT. Como era de esperar, los ratones que recibieron células BaF3 de control que expresaron MEK1 N3 solo estuvieron vivos al final del periodo del estudio de 55 días. Se realizaron las autopsias 19 días después del trasplante, en una cohorte de 3 ratones por grupo de tratamiento para seguir la progresión de la enfermedad. De acuerdo con la supervivencia global reducida, se encontró una proporción significativa de células BaF3 marcadas con GFP en la médula ósea y los bazo de ratones que recibieron AKT1 mutante, en comparación con ratones que recibieron WT AKT1 o células de control de vector. Se encontró un agrandamiento significativo del hígado y el bazo en ratones que expresan AKT1 mutante. El examen histológico de secciones de hígado, bazo y médula ósea teñidas con hematoxilina y eosina (HyE) mostró evidencia de infiltración con blastos leucémicos en ratones que recibieron células AKT1 mutantes transducidas en comparación con las que recibieron células de control de vector o WT AKT1. Estos resultados confirman el potencial transformante de los mutantes de AKT1 *in vivo*.

Los mutantes deficientes en la interacción PH-KD de AKT1 son menos sensibles a inhibidores alostéricos

Varios inhibidores competitivos y alostéricos de ATP de molécula pequeña de AKT están en desarrollo y/o ensayos clínicos (Mattmann et al., (2011). Expert Opin Ther Pat.; Pal et al., (2010). Expert Opin Investig Drugs 19, 1355-1366). Estudios previos han mostrado que los inhibidores alostéricos de AKT requieren la presencia de una interfase PH-KD intacta para su actividad. Dado que algunos mutantes somáticos de AKT1 tienen contactos PH-KD alterados, se predijo que era probable que los inhibidores alostéricos fueran menos eficaces en inhibir la actividad de estos mutantes. Se probó la actividad de dos inhibidores competitivos de ATP (GNE-692 Bencsik et al. (2010). Bioorg Med Chem Lett 20, 7037-7041) y GSK690693 (Rhodes et al. (2008). Cancer Res 68, 2366-2374) y dos inhibidores alostéricos (inhibidor VIII (Lindsley et al., (2005). Bioorg Med Chem Lett 15, 761-764) y GNE-929 en enzimas AKT1 WT y mutantes recombinantes de longitud completa. También se probó el efecto de los inhibidores sobre la proliferación de células NIH3T3 que expresan WT o mutantes de AKT1.



En ensayos bioquímicos de actividad, los inhibidores competitivos de ATP GNE-692 y GSK690693 fueron eficaces en bloquear la actividad de la enzima AKT1 WT (Cl_{50} de GNE-692 24,3 nM), así como las enzimas mutantes (E17K, L52R y D323H; Cl_{50} de GNE-692 3,7-15,8 nM). Similarmente, los inhibidores competitivos de ATP fueron igualmente de eficaces contra tanto AKT1 WT como AKT1 mutante en el ensayo de proliferación basado en células. A diferencia, los inhibidores alostéricos, inhibidor VIII y GNE-929, fueron menos eficaces contra enzimas mutantes recombinantes de longitud completa (inhibidor VIII: Cl_{50} 268,4 nM para L52R; $Cl_{50} > 1 \mu M$ para D323H) en comparación con AKT1 WT (inhibidor VIII: Cl_{50} 119,3 nM; Figura 6C). De acuerdo con esto, en un ensayo basado en células, se encontró que el inhibidor alostérico, el inhibidor VIII, era al menos 50 % menos eficaz en bloquear la proliferación de células que expresan AKT1 mutante en comparación con AKT WT.

Para confirmar que la sensibilidad reducida de los mutantes a inhibidores alostéricos era debida a las interacciones PH-KD alteradas, se realizó un ensayo de reconstitución bioquímica *in vitro* usando dominios PH y cinasa recombinantes purificados. En este sistema, el inhibidor VIII alostérico, cuando se ensayó contra el dominio cinasa de AKT1 solo, fue incapaz de bloquear su actividad. Sin embargo, cuando se añadió el dominio PH WT purificado al dominio cinasa y se reconstituyó la enzima, el inhibidor VIII fue capaz de bloquear la actividad de la enzima, aunque hubo un aumento de tres veces en Cl_{50} para la enzima reconstituida (Cl_{50} 238,8 nM) en comparación con la enzima WT de longitud completa (Cl_{50} 80,8 nM). A diferencia, la reconstitución con el dominio PH mutante (L52R o E17K) alteró adicionalmente la capacidad del inhibidor VIII de bloquear AKT1 (Cl_{50} de L52R 713,5 nM y Cl_{50} de E17K $> 1 \mu M$). Similarmente, el inhibidor VIII no mostró actividad cuando el dominio PH WT se reconstituyó con un dominio cinasa de D323H mutante. La ausencia de inhibición de E17K por inhibidores alostéricos sugiere que además de la afinidad aumentada por PIP2, esta mutación también puede afectar la interacción PH-KD que conduce a su activación. En el ensayo de 2 híbridos basado en célula, el mutante E17K no reveló un defecto en la interacción PH-KD que indica que el mecanismo exacto de la activación de E17K requiere investigación adicional. Estos datos confirman la importancia de una interfase PH-KD intacta para los inhibidores alostéricos de AKT1.

Ensayos de biomarcadores PD sustitutos

Se usó fosfo-GSK-3 β en plasma rico en plaquetas (PRP) como un biomarcador PD sustituto para medir la inhibición de la vía de Akt en pacientes después del tratamiento con GDC-0068 en diferentes momentos de tiempo durante 22 días. Se recogió sangre periférica en Vacutainer que contenía 0,38 % de citrato como anticoagulante. Se centrifugó la sangre a 200 g durante 15 min a temperatura ambiente. Se tomó cuidadosamente la capa de PRP del tubo y entonces se lisó en un tampón que contenía detergentes, proteasa e inhibidores de fosfatasa. Se midieron niveles de GSK-3 β fosforilado y totales en lisados de PRP usando un ensayo de MSD multiplexado de fosfo-GSK3 β / GSK3 β total. Se normalizaron los niveles de pGSK-3 β a niveles de GSK-3 β totales y se expresó la inhibición después de la dosis de pGSK-3 β como una relación de los niveles pre-dosis para cada paciente. Se demostró una respuesta farmacológica dependiente de la dosis y el tiempo, con una disminución en el nivel de pGSK3 β de ≥ 75 % a dosis ≥ 200 mg.

Matrices de proteína de fase inversa

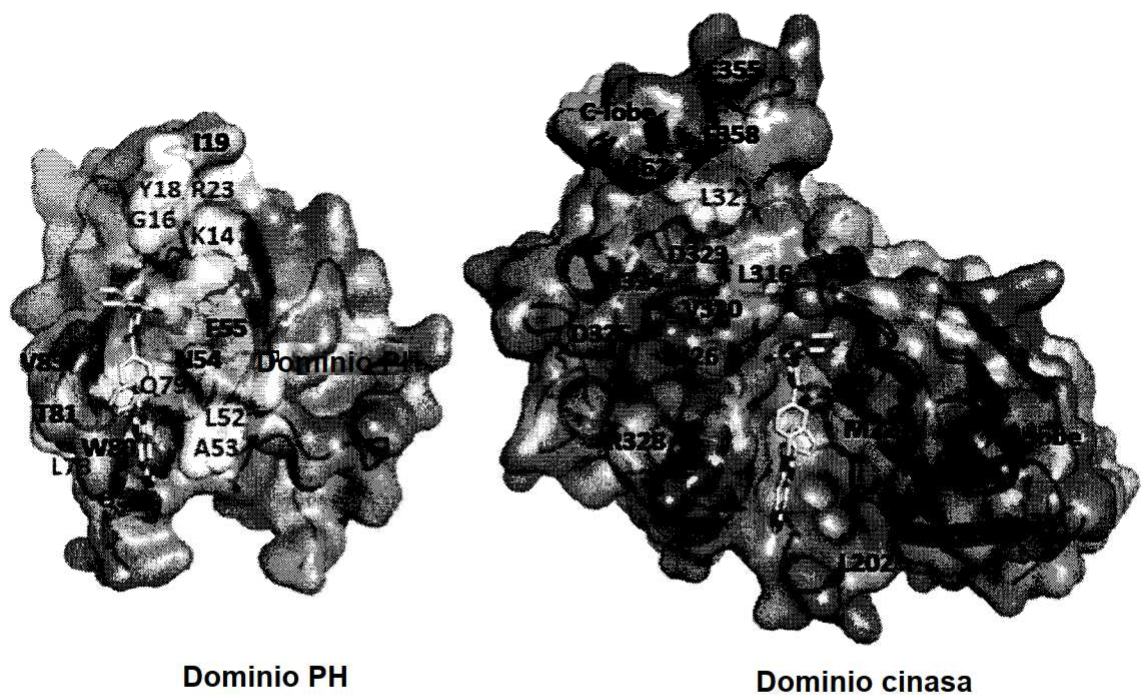
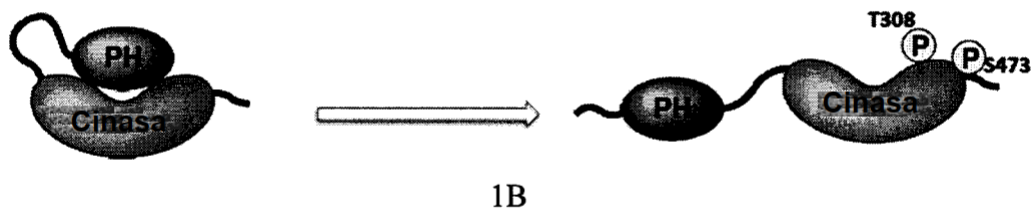
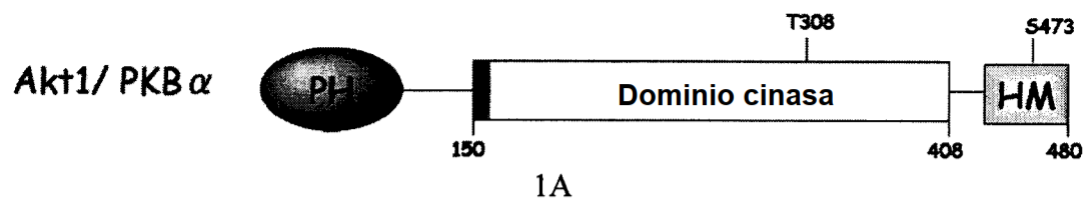
Se ultracongelaron en OCT biopsias de tumor con aguja gruesa de pacientes tratados con GDCC0068 y se seccionaron en rebanadas de 8 μm . Se lisó el tejido en tampón de lisis RPPA que contenía TPER, NaCl 300 mM e inhibidores de fosfatasa. Se analizaron grupos de fosfoproteína de los lisados usando matrices de proteína de fase inversa: se imprimieron muestras sobre portaobjetos de nitrocelulosa y se tiñeron con Sypro para determinar concentraciones de proteína total. Cada portaobjetos se tiñó con un anticuerpo diferente a 4 °C durante la noche. Los datos se normalizaron entonces a niveles totales de proteína y se retiraron los efectos especiales usando normalización de la mediana Quadrant. Las disminuciones de 60 %-70 % en pPRAS40 y ~ 50 % de disminución en ciclina D1 (en comparación con el nivel inicial) ocurrió en los 3 pacientes tratados con 400 mg diariamente. Para métodos y una visión general de RPPA véase: Reverse phase protein microarrays advance to use in clinical trials, Molecular Oncology. 2010 Dec;4(6):461-81, Mueller C *et al.* En ciertas realizaciones, el cáncer que se va a tratar en el presente documento comprende una o más de las mutaciones AKT, PI3k, PTEN y HER2 o la señalización aberrante de AKT, PI3k, PTEN o HER2. En un ejemplo, el cáncer es cáncer gástrico que comprende alta actividad de pAKT y estado bajo o nulo de PTEN.

Aunque se describen ciertas realizaciones de invención, y se han expuesto muchos detalles para los fines de ilustración, ciertos de los detalles se pueden variar sin apartarse de los principios básicos de la invención.

Se debe interpretar que el uso de los términos "un", "una", "el" y "la" y términos similares en el contexto de la descripción de realizaciones de la invención cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos de extremos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a"), a menos que se indique lo contrario. La citación de intervalos de valores en el presente documento pretende simplemente servir de método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento. Además del orden detallado en el presente documento, los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, está previsto simplemente para iluminar mejor las realizaciones de invención y no impone necesariamente una limitación al alcance de la invención, a menos que se cite específicamente de otro modo en las reivindicaciones. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva se debe interpretar como que indique que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de predicción de la sensibilidad del crecimiento de una célula tumoral a un inhibidor de AKT, que comprende determinar la presencia de una mutación de AKT, en donde la presencia de una mutación de AKT se correlaciona con la sensibilidad de la célula al inhibidor de AKT, en donde el inhibidor de AKT es (S)-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilamino)propan-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde la mutación corresponde a, o se alinea con, L52, K189 o D323.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la célula muestra sensibilidad aumentada al inhibidor de AKT.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la AKT es AKT1, AKT2 o AKT3; o en donde la AKT es AKT1.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la mutación de AKT altera la interacción entre el dominio PH y el dominio cinasa de AKT.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la mutación de AKT aumenta la fosforilación de AKT, y opcionalmente en donde el aumento en la fosforilación es debido a fosforilación constitutiva.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el método comprende además determinar el estado de PTEN de la célula, en donde la pérdida de PTEN se correlaciona con sensibilidad aumentada al inhibidor.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la célula tumoral es una célula tumoral de cáncer de ovario o de próstata.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el método comprende además determinar la presencia de una mutación PI3K de la célula, en donde la presencia de una mutación PI3K se correlaciona con la sensibilidad aumentada a la inhibición por el inhibidor, opcionalmente en donde dichas mutaciones PI3K son una o ambas de H1047R y H1047L.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el método comprende además determinar el perfil de pAKT de la célula, en donde:
 - un perfil de alta actividad para pAKT se correlaciona con la sensibilidad aumentada a la inhibición por el inhibidor; o
 - un perfil de baja actividad para pAKT se correlaciona con la sensibilidad reducida a la inhibición por el inhibidor.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el método comprende además:
 - a) determinar el estado de Her2 y/o Her3 de la célula, en donde un estado de Her2+ y/o Her3+ de la célula se correlaciona con la sensibilidad aumentada a la inhibición por el inhibidor; o
 - b) determinar la presencia de una mutación de cinasa Met de la célula, en donde la presencia de una mutación de cinasa Met se correlaciona con la sensibilidad de la célula al inhibidor de AKT; o
 - c) determinar la presencia de una mutación B-Raf o K-Ras de la célula, en donde la presencia de una mutación B-Raf o K-Ras se correlaciona con una disminución en la sensibilidad de la célula al inhibidor de AKT; o
 - d) determinar el perfil de localización de FOXO3a en la célula, en donde un perfil de localización citoplásmica de FOXO3a se correlaciona con sensibilidad de la célula a la inhibición por el inhibidor de Akt; o
 - e) determinar el estado de INPP4B, PHLPP y/o PP2A de la célula, en donde la pérdida de INPP4B, PHLPP, y/o PP2A se correlaciona con la sensibilidad aumentada al inhibidor.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 u 8-10, en donde la célula tumoral es una célula de cáncer de próstata, ovario, mama, gástrico o pancreático; o en donde la célula tumoral es una célula de cáncer de mama resistente endocrina.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además determinar la presencia de la mutación de AKT en una muestra fisiológica de un paciente, y opcionalmente que comprende además informar a un paciente para el que se ha determinado la presencia de una mutación de AKT que se debe administrar un inhibidor de AKT, o no se debe administrar.
13. GDC-0068 o una sal del mismo para su uso en un método de tratamiento de una célula cancerosa que comprende una o más mutaciones de AKT, en donde la mutación corresponde a, o se alinea con, L52, K189 o D323.



1C

FIG 1

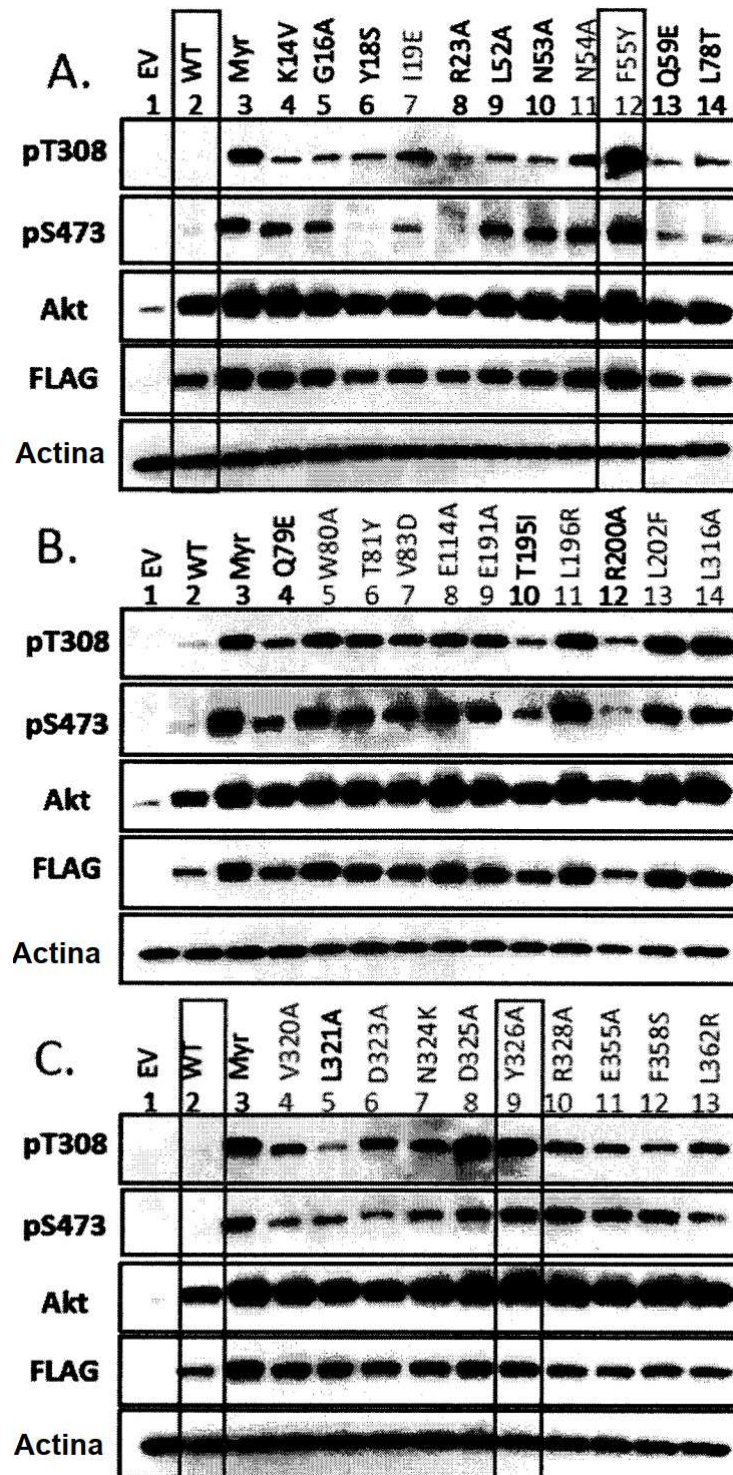


FIG 2

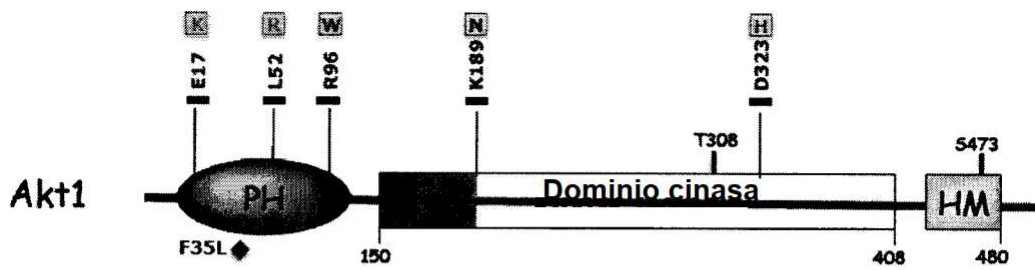


FIG 3

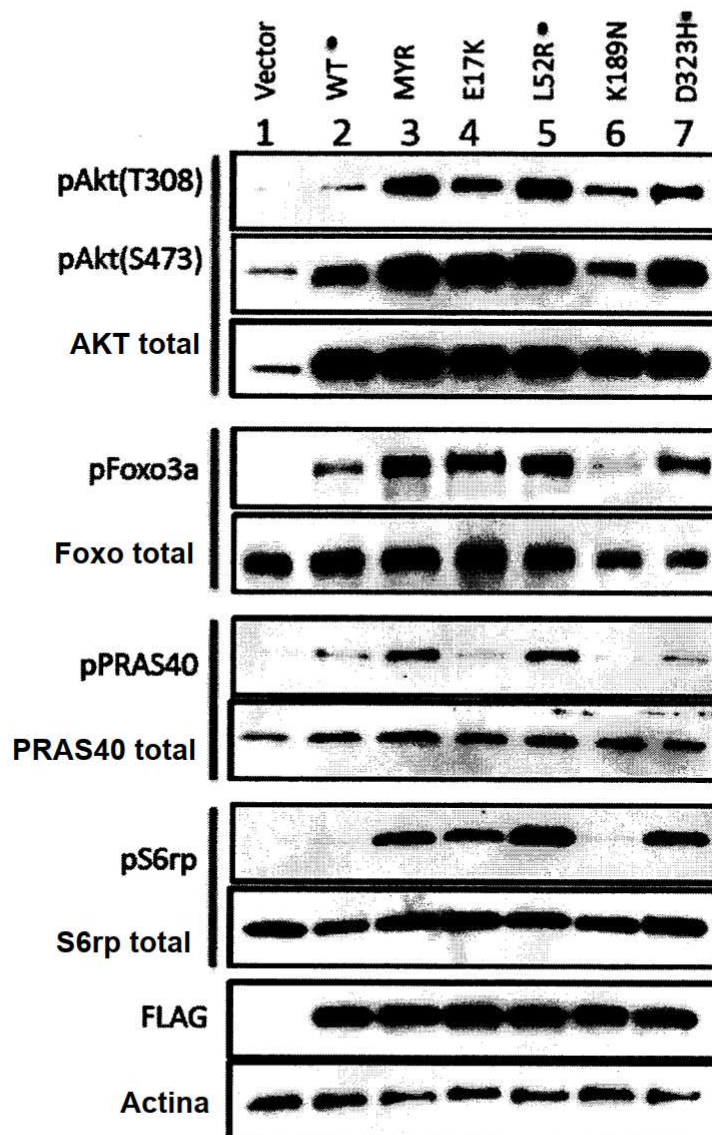


FIG 4

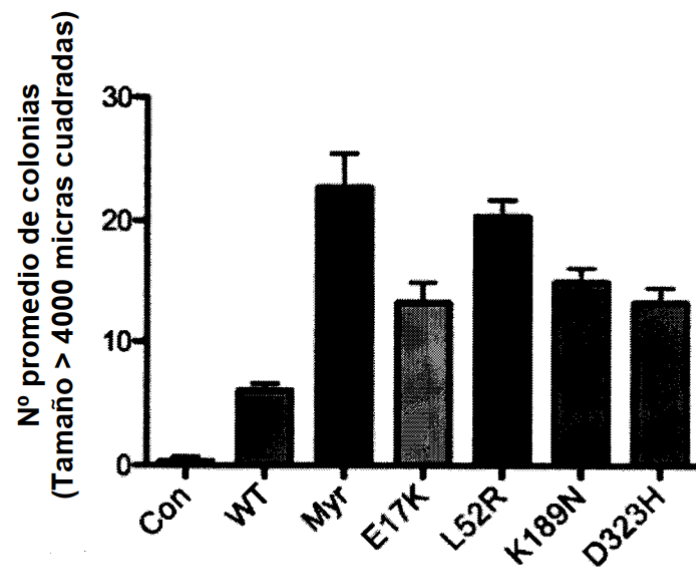
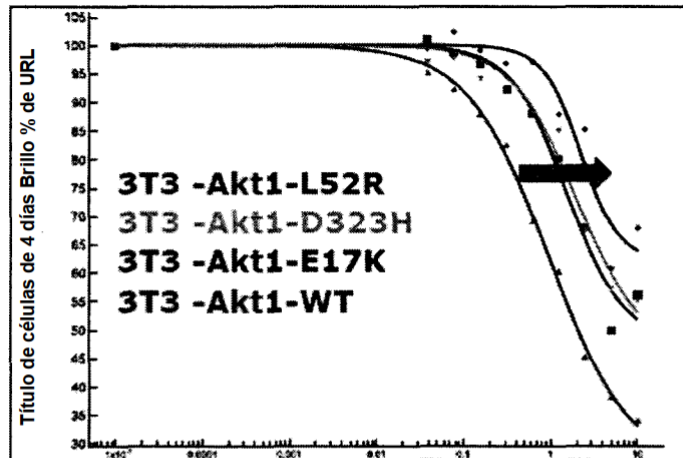
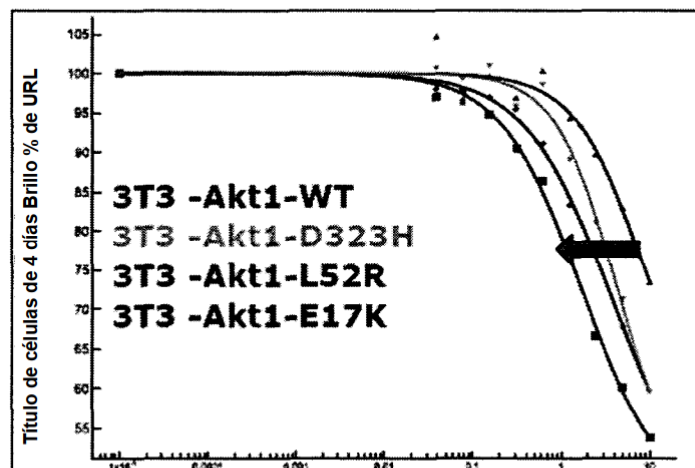


FIG 5

A. GDC-0941 (inhibidor pan-PI3K)



B. GDC-0068 (inhibidor Akt ATP comp)



C. MK2206 (inhibidor alostérico de Akt)

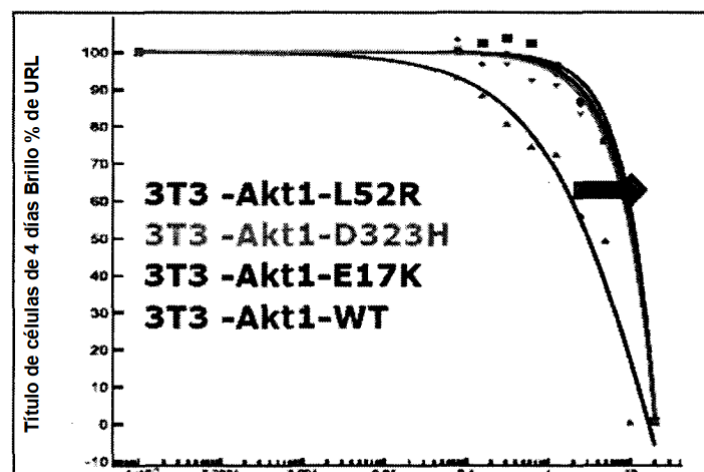
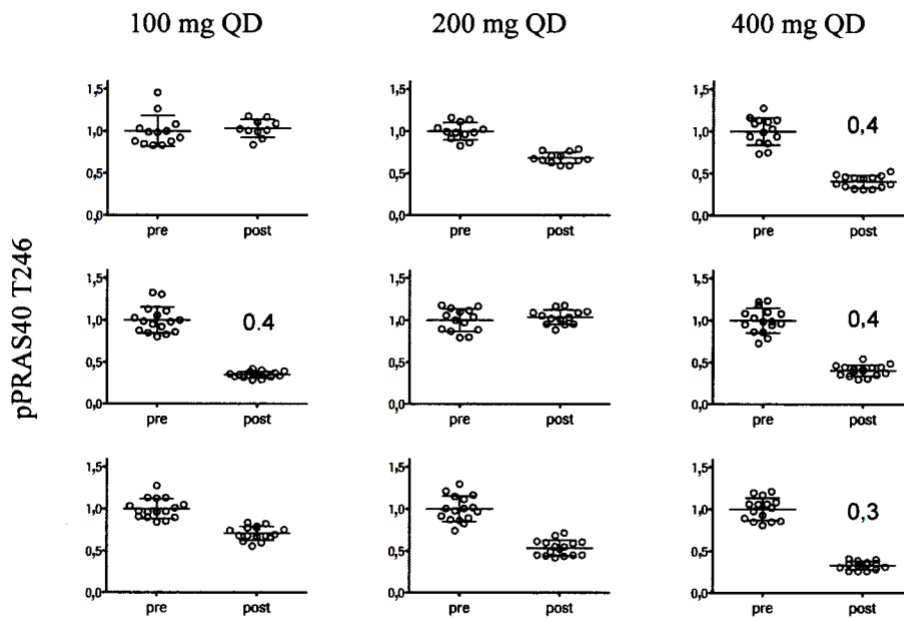


FIG 6

Cambios de pPRAS40 T246 en tumores de pacientes tratados



* Los 3 pacientes en la cohorte de 400 mg mostraron > 60 % de inhibición.

FIG 7

Tumores con vía de PI3K/AKT activada

Conductores de la vía																			
	BC	NSCLC	Próstata	HNSCC	Gástrico	CRC	PDAC	Mela	HCC	Renal	Ovarios	Endo	Vejiga	Meso	SCLC	GBM	AML	NHL	MM
Pi3K Mut	28%	3%	2%	11%	8%	14-30%			35%	3%	6%	35%	12%			6%			
PI3K Amp		73% sq 24% ad		37%	36%	30%					30%	10%	10-50%						
Pérdida de PTEN	30%	24%	75-100%	29%	40%	10-20%	20-75%	30%	16-40%	35%	50% endo 25% ser	30-80%	40%	0-62%	10-20%	70-90%	4%	5%	6%
AKT Amp.	3%			17-30%AKT2	20% AKT1		20% AKT2				12%								
AKT Mut.	2-8%	1%				1%					2%								
LKB1 Mut		15%																	
KRAS		20%				40%	~90%												
BRAF						15%	2%	50%											
NRAS								15%											

- Los números de pérdida de PTEN son de IHC, FISH, aCHG, mutaciones.
*Se necesita confirmar usando ensayos internos validados.
- La pérdida de PTEN se asoció normalmente con enfermedad avanzada, mal pronóstico (próstata, cáncer de mama, gástrico, excepto de ovarios)

FIG 8

Alta actividad de AKT predice la sensibilidad a GDC-0068

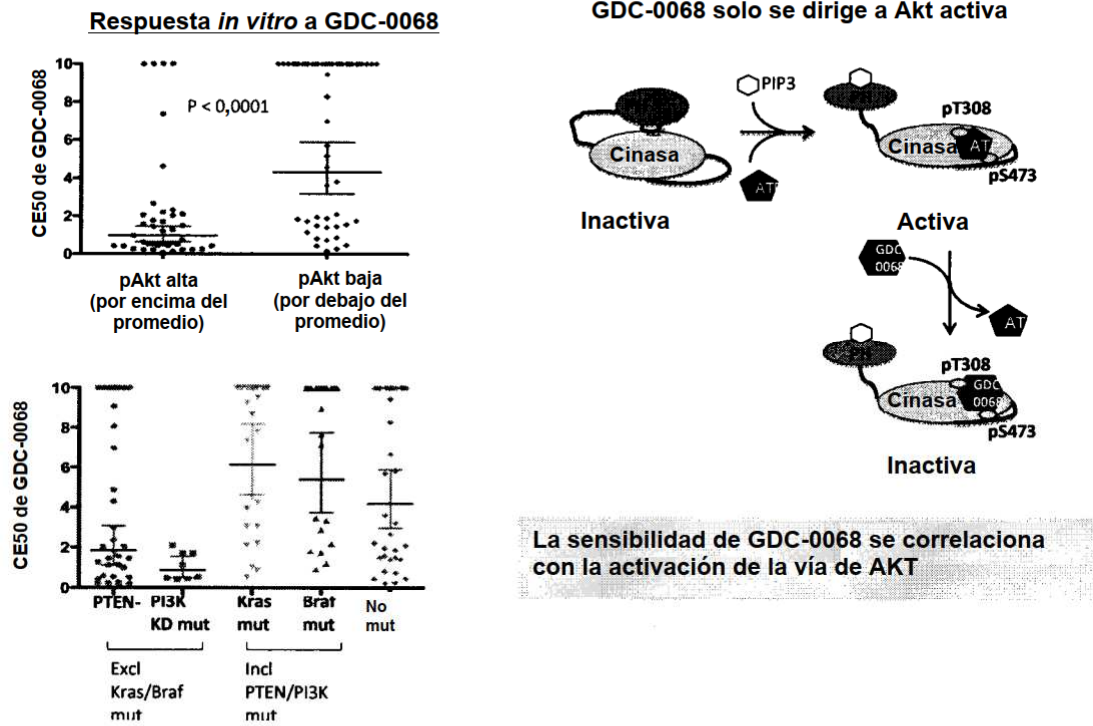


FIG 9

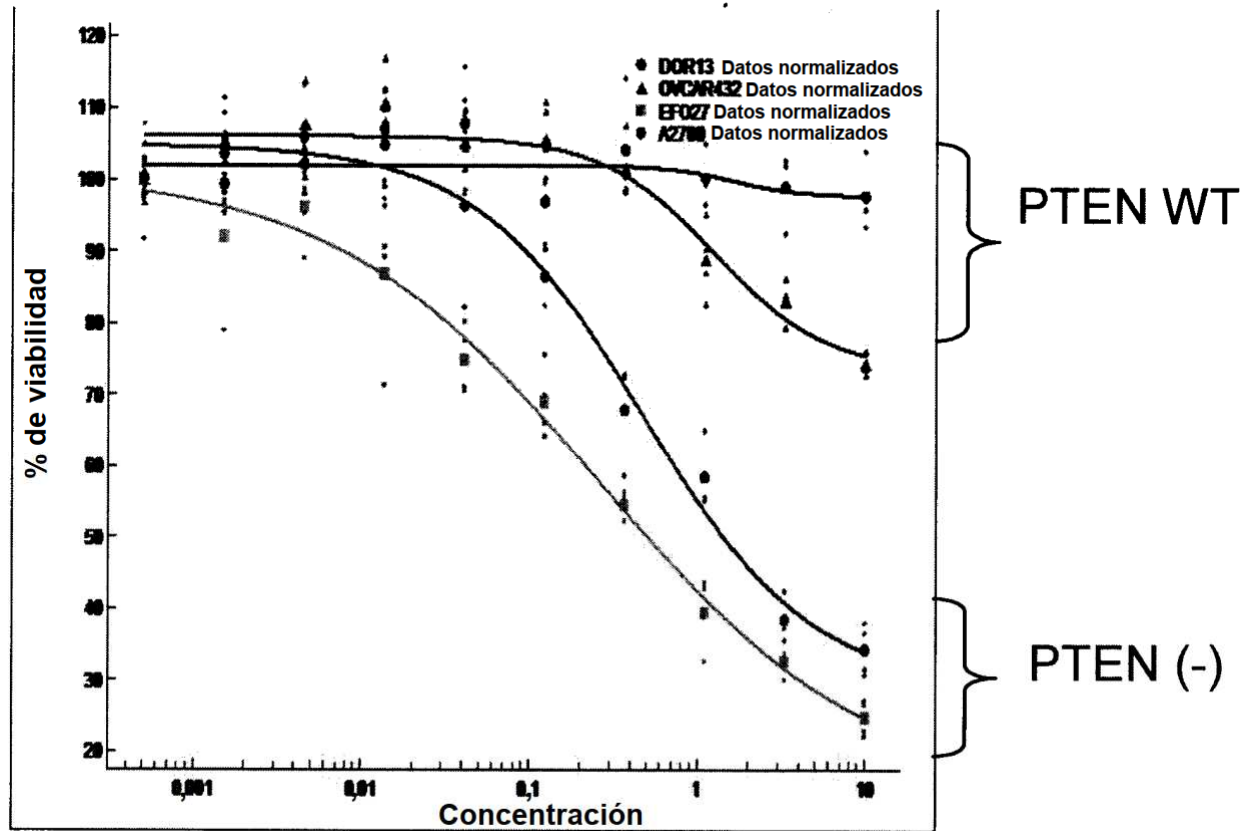


FIG 10

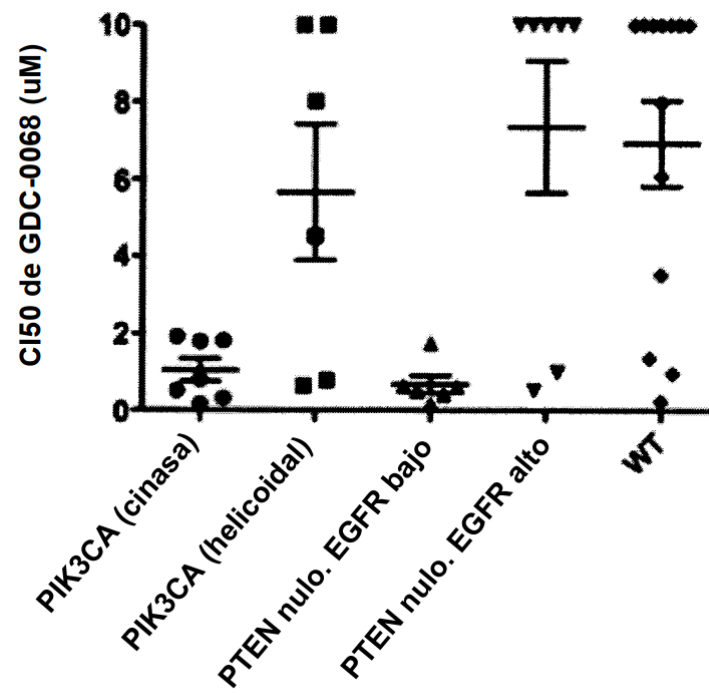


FIG 11

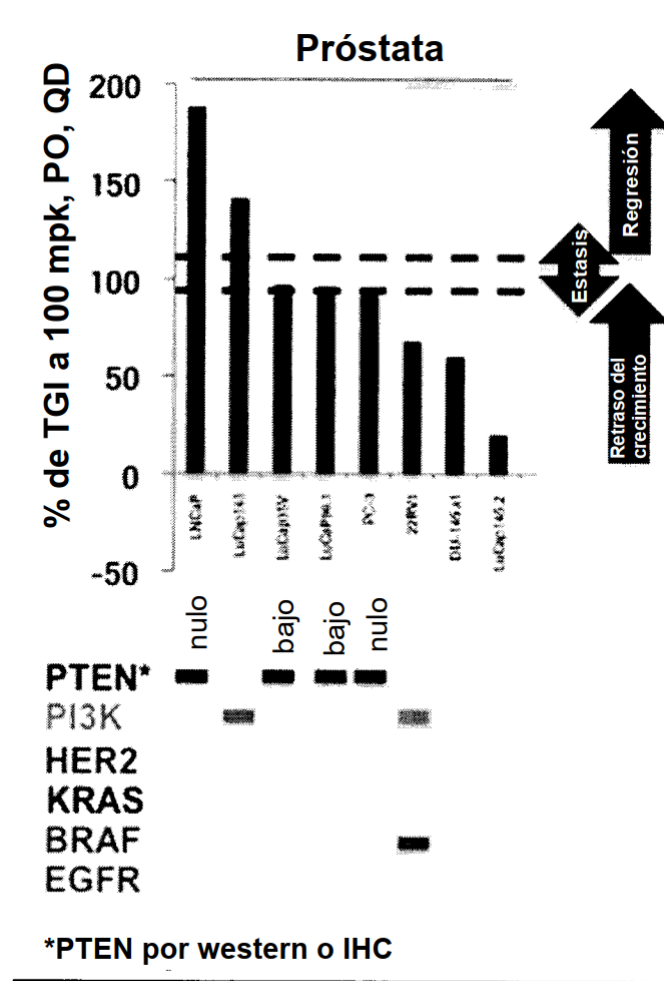


FIG 12A

☐ Eficacia fuerte
(estasia/regresión):

- ✓ LnCaP Próstata
- ✓ PC3 Próstata
- ✓ LuCaP35v Próstata (tumor primario)
- ✓ LuCaP141 Próstata (tumor primario)
- ✓ LuCaP96.1 Próstata (tumor primario)
- ✓ U87MG Glioblastoma
- ✓ IGROV-1 Ovarios
- ✓ SKOV3 Ovarios
- ✓ TOV-21G-X1 Ovarios
- ✓ BT474M1 Mama
- ✓ KPL4 Mama
- ✓ MCF7.1 Mama
- ✓ HCC1954.x1 Mama
- ✓ HM7 Colon
- ✓ 537Mel Melanoma
- ✓ HGC-27 Gástrico
- MAXF401 Mama (tumor primario)
- Fo5 Mama (aloinjerto de ratón Tg Her2+)

☐ Eficacia modesta (retraso del crecimiento):

- ✓ LuCaP145.2 Próstata (tumor primario)
- ✓ LuCaP77 Próstata (tumor primario)
- ✓ OVCAR3 Ovarios
- ✓ A2058.x1 Melanoma
- ❖ Lovo Colon
- DoHH2 NHL

☐ Poca actividad/ninguna:

- ❖ Panc-1 Pancreático
- ❖ NCI H2122 NSCLC
- ❖ MDA-MB.231 Mama

- ✓ **Mutación/amplificación de PI3K o mutación de PTEN**
- ❖ **Mutación de KRas o BRaf**

FIG 12B

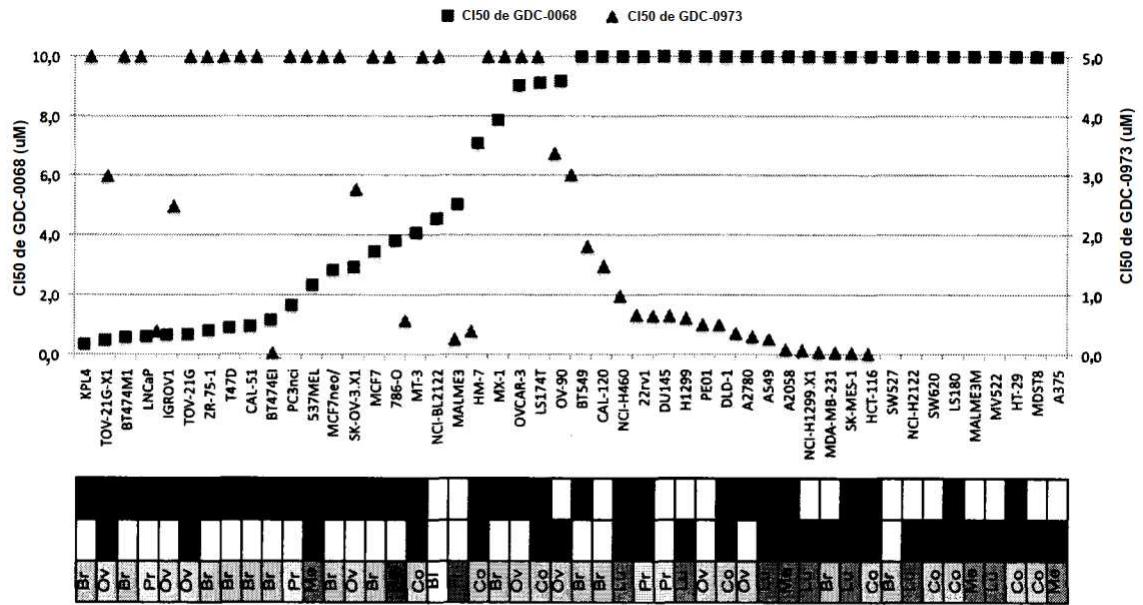


FIG 13

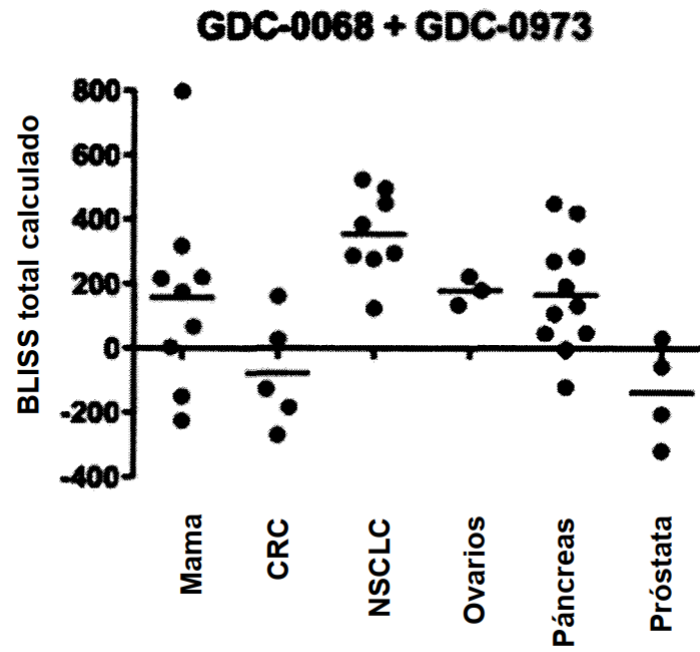


FIG 14

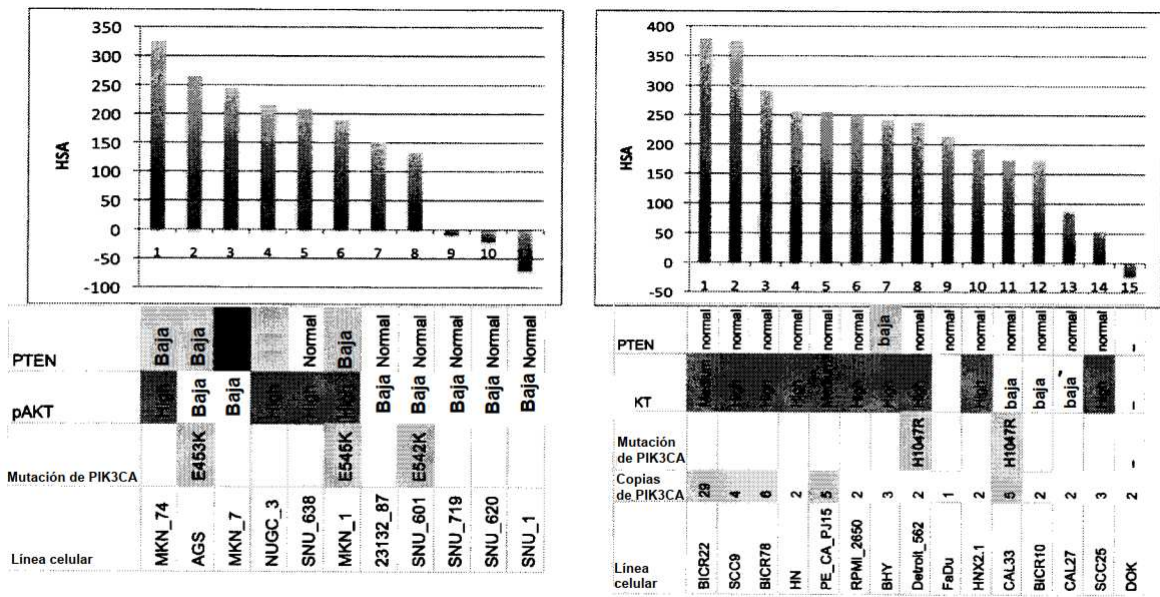


FIG 15

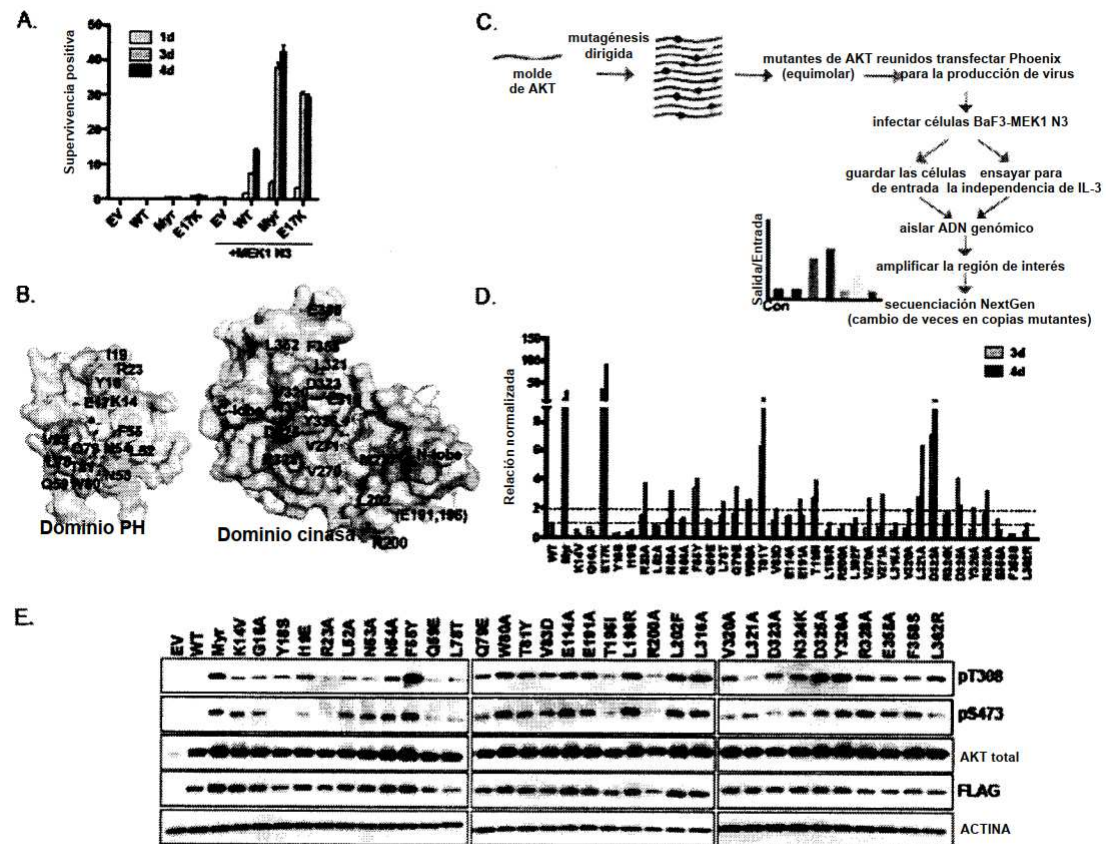


FIG 16

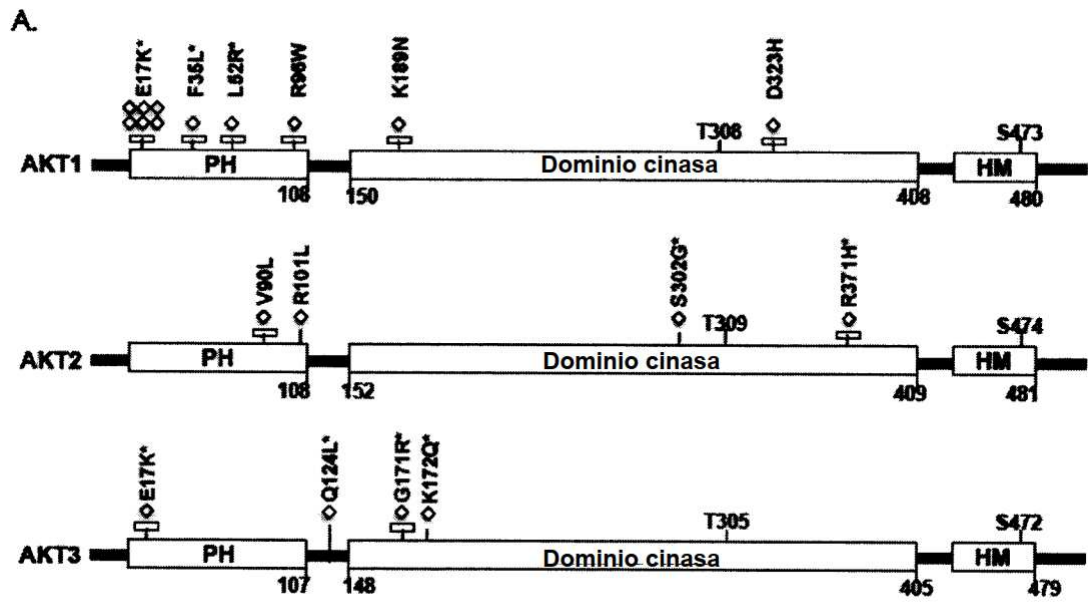


FIG 17