

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 855 698**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68	(2008.01) A61K 31/4745	(2006.01)
A61K 31/5365	(2006.01) A61K 31/519	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01) A61K 31/52	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) A61K 31/5377	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01) A61K 31/7064	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01) G01N 33/574	(2006.01)
A61K 31/436	(2006.01) C12Q 1/6886	(2008.01)
A61K 31/366	(2006.01)	
A61K 31/4155	(2006.01)	
A61K 31/4375	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2014** **E 19172747 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020** **EP 3543355**

54 Título: **Método para predecir la eficacia terapéutica del inhibidor de PI3K/AKT/mTOR basándose en la expresión de PHLDA1 o PIK3C2B**

30 Prioridad:

20.06.2013 JP 2013129591

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

24.09.2021

73 Titular/es:

TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
1-27 Kandanishiki-cho Chiyoda-ku
Tokyo 101-8444, JP

72 Inventor/es:

ABE, TETSUYA y
ITADANI, HIRAKU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 855 698 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

Método para predecir la eficacia terapéutica del inhibidor de PI3K/AKT/mTOR basándose en la expresión de PHLDA1 o PIK3C2B

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para predecir la eficacia terapéutica de una quimioterapia utilizando un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR, un agente antitumoral y un kit.

Antecedentes de la técnica

La ruta de señalización de PI3K/AKT/mTOR regula diversas funciones celulares importantes, tales como la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis y el glucometabolismo. La ruta se conoce por ser hiperactiva en una amplia gama de tumores malignos (bibliografía no de patente 1). Se han realizado ensayos clínicos sobre muchos inhibidores de PI3K/AKT/mTOR utilizados como un agente antitumoral (por ejemplo, inhibidor de PI3K, inhibidor de AKT, inhibidor de mTOR o inhibidor dual de PI3K-mTOR). Sin embargo, en ensayos clínicos que utilizan concretamente un inhibidor dirigido a PI3K o AKT como un fármaco único, ninguno de estos ha demostrado beneficios clínicos satisfactorios (bibliografía no de patente 2).

Los fármacos dirigidos molecularmente, tales como los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR, pueden mostrar normalmente una potencia elevada sobre células tumorales en las que las moléculas diana se expresan altamente o son hiperactivas. Por tanto, es importante estratificar pacientes utilizando un marcador predictivo de eficacia terapéutica para seleccionar un grupo de pacientes para los que se esperan los efectos beneficiosos (bibliografía no de patente 3). En cuanto a los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR, se han examinado como un marcador predictivo de eficacia terapéutica en la práctica clínica la mutación de PIK3CA, la delección de PTEN y similares (bibliografía no de patente 4).

El uso de los inhibidores de PI-701 o PI-702 contra las células cancerosas que expresan niveles altos de PIK3C2B se ha desvelado en la bibliografía no de patente 5.

En la bibliografía de patente 6 se ha desvelado una composición farmacéutica que contiene un polipéptido que contiene un dominio PH o una proteína de la familia PHLDA que puede utilizarse para el tratamiento de tumores.

En la bibliografía no de patente 7 se ha examinado la expresión del gen PIK3C2B en muestras de ESCC e investigado si había una relación con las características clínicas e histopatológicas.

En la bibliografía no de patente 8 se ha demostrado que varios genes relacionados con la ruta de PI3k/Akt son dianas para alteraciones genéticas en glioblastomas y se han mostrado pruebas de la amplificación y/o sobreexpresión de PI K3C2B, PIK3CD, IRS2 y AKT1 en estos tumores. Si bien en la bibliografía no de patente 9, se ha demostrado que se puede utilizar JFCR39-DB como una herramienta para identificar biomarcadores predictivos y para estudiar la farmacología molecular de la ruta de PI3K en cáncer. En la bibliografía no de patente 10 se ha subrayado el progreso reciente que se ha hecho en la comprensión de la ruta de PI3K.

En la bibliografía no de patente 11 se desvela un compuesto de imidazo-oxazina que demuestra un efecto de inhibición de AKT útil como un agente antitumoral. Aunque, en la bibliografía no de patente 12 se desvela una visión de conjunto del conocimiento actual de la ruta de PI3K con un énfasis sobre su aplicación en el tratamiento del cáncer.

Como se ha indicado anteriormente, se han desarrollado intensivamente diversos inhibidores de PI3K/AKT/mTOR. Sin embargo, su eficacia terapéutica sobre todos los pacientes de cáncer ha permanecido insatisfactoria y no se han encontrado marcadores predictivos de eficacia terapéutica capaces de estratificar pacientes para seleccionar un grupo de pacientes que es probable que respondan suficientemente a los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR.

Listado de citas

Bibliografía no de patentes y de patentes

Bibliografía no de patente 1: Nature Reviews Cancer 2, 489-501 (2002)

Bibliografía no de patente 2: Nature Reviews Cancer 9, 550-562 (2009)

Bibliografía no de patente 3: Nature Reviews Clinical Oncology 8, 587-596 (2011)

Bibliografía no de patente 4: Lancet Oncology 12, 594-603 (2011)

Bibliografía no de patente 5: Anticancer research 32, 3015-3028 (2012) Bibliografía de patente 6: documento WO 2010/087497 (2010)

Bibliografía no de patente 7: The Journal of international medical research 39, 1319-1332 (2011)

Bibliografía no de patente 8: Brain pathology Zuerich 13, 507-518 (2003)

Bibliografía no de patente 9: Cancer research 70, 4982-4994 (2010)
 Bibliografía no de patente 10: Nature reviews drug discovery 8, 627-644 (2009)
 Bibliografía de patente 11: documento WO 2012/137870 (2012)
 Bibliografía no de patente 12: Future medicinal chemistry 4, future science ltd, 1153-1169 (2012)

Sumario de la invención

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una quimioterapia utilizando un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR que produzca un efecto antitumoral excelente en un paciente de cáncer.

Solución del problema

Los presentes inventores han realizado una investigación extensa sobre la relación entre la expresión de diversos genes y la eficacia terapéutica de los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR y encontraron que los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR (en concreto, trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazina-2-il)fenil)ciclobutanol) tienen un efecto antitumoral significativamente alto sobre los pacientes de cáncer que muestran un nivel de expresión alto de PIK3C2B. A continuación, los inventores completaron la invención.

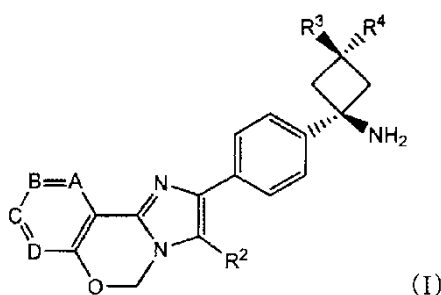
No ha habido informes sobre la relación de los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR con PIK3C2B.

Específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente

Artículo 1.

Un método para predecir la eficacia terapéutica de una quimioterapia utilizando un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR en un paciente de cáncer basándose en un nivel de expresión de PIK3C2B en células tumorales aisladas del paciente de cáncer, que comprende las siguientes etapas (1) y (2):

- (1) medir un nivel de expresión de PIK3C2B en una muestra biológica que contiene células tumorales aisladas del paciente; y
 - (2) predecir que es probable que el paciente responda suficientemente a la quimioterapia utilizando el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR cuando el nivel de expresión de PIK3C2B medido en la etapa (1) es igual o mayor que un punto de corte predeterminado;
- en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es un compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable



en donde

A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente o uno o dos de los A, B, C y D así definidos se reemplazan por nitrógeno;
 al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el(los) otro(s) representa(n) cada uno halógeno, ciano, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente, o grupo heterocíclico insaturado;
 R² representa fenilo, piridilo o tienilo;
 R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y
 R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo;
 en donde el punto de corte predeterminado para el nivel de expresión de PIK3C2B es el valor de la media o la mediana de los niveles de expresión de PIK3C2B de pacientes de cáncer o un valor en el que el valor *p* de la prueba del rango logarítmico realizada para la eficacia terapéutica es menor que 0,1.

Artículo 2.

El método de acuerdo con el Artículo 1, en donde el compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula

(I) es un compuesto en donde A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente o uno cualquiera o dos de los así definidos A, B, C y D se reemplazan por nitrógeno;

al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el(los) otro(s) representa(n) cada uno cloro, flúor, ciano, metilo, hidroximetilo, metoxi, etoxi, carboxilo, carbamoilo, metilaminocarbonilo, etilaminocarbonilo, hidroxietilaminocarbonilo, etoxiaminocarbonilo o pirazolilo;

R² representa fenilo, piridilo o tienilo;

R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y

R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo.

Artículo 3.

El método según el Artículo 1 o 2, en donde el compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) es cualquiera de los siguientes compuestos (a) a (t),

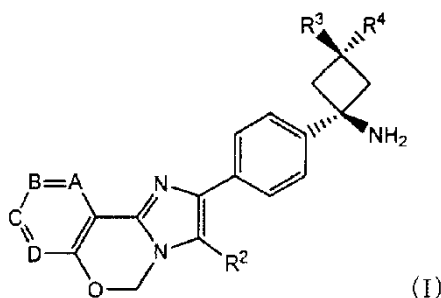
- (a) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-fluoro-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (b) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-fluoro-3-(piridin-4-il)-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (c) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (d) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (e) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(9-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (f) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(8-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (g) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (h) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (i) trans-3-amino-1-etil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (j) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (k) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (l) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[4,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (m) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[4,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (n) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,2-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (o) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirazino[2,3-e][1,3]oxazina-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (p) trans-3-amino-3-(4-(9-(hidroximetil)-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)-1-metilciclobutanol,
- (q) 2-(4-(trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-9-carbonitrilo,
- (r) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-9-(1H-pirazol-5-il)-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (s) 2-(4-(trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-N-metil-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-8-carboxamida y
- (t) 2-(4-(trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-N-etoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-8-carboxamida.

Artículo 4.

El método según uno cualquiera de los Artículos 1 a 3, en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol.

Artículo 5.

Un agente antitumoral para utilizar en el tratamiento de un paciente de cáncer, el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR y el paciente de cáncer que tiene células tumorales en las que un nivel de expresión de PIK3C2B es igual o mayor que un punto de corte predeterminado, en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es un compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable



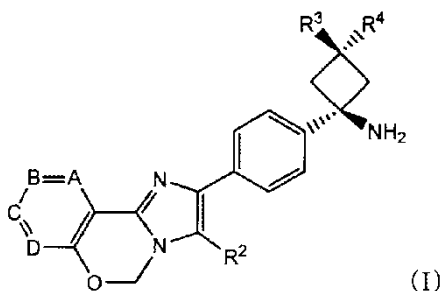
en donde

A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente o uno o dos de los así definidos A, B, C y D se reemplazan por nitrógeno;
 al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el(los) otro(s) representa(n) cada uno halógeno, ciano, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente, o grupo heterocíclico insaturado;
 R² representa fenilo, piridilo o tienilo;
 R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y
 R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo;
 en donde el punto de corte predeterminado para el nivel de expresión de PIK3C2B es el valor de la media o la mediana de los niveles de expresión de PIK3C2B de pacientes de cáncer o un valor en el que el valor *p* de la prueba del rango logarítmico realizada para la eficacia terapéutica es menor que 0,1.

Artículo 6.

Un agente antitumoral para utilizar en el tratamiento de un paciente de cáncer que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR, administrándose el agente antitumoral a un paciente que se predice que es probable que responda suficientemente a una quimioterapia utilizando el agente antitumoral mediante un método que comprende las siguientes etapas (1) y (2):

- (1) medir un nivel de expresión de PIK3C2B en una muestra biológica que contiene células tumorales aisladas del paciente; y
- (2) predecir que es probable que el paciente responda suficientemente a la quimioterapia utilizando el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR cuando el nivel de expresión de PIK3C2B medido en la etapa (1) es igual o mayor que un punto de corte predeterminado, en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es un compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable

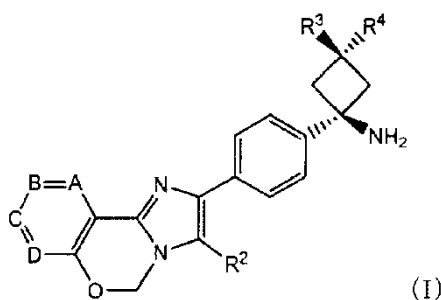


en donde

A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente o uno o dos de los así definidos A, B, C y D se reemplazan por nitrógeno;
 al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el(los) otro(s) representa(n) cada uno halógeno, ciano, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente, o grupo heterocíclico insaturado;
 R² representa fenilo, piridilo o tienilo;
 R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y
 R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo;
 en donde el punto de corte predeterminado para el nivel de expresión de PIK3C2B es el valor de la media o la mediana de los niveles de expresión de PIK3C2B de pacientes de cáncer o un valor en el que el valor *p* de la prueba del rango logarítmico realizada para la eficacia terapéutica es menor que 0,1.

Artículo 7.

Un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR para utilizar en el tratamiento de un paciente de cáncer, que se predice mediante el método según uno cualquiera de los Artículos 1 a 4, que es probable que responda suficientemente a una quimioterapia utilizando el agente antitumoral; en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es un compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable



en donde

- 5 A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente o uno o dos de los así definidos A, B, C y D se reemplazan por nitrógeno;
 al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el(los) otro(s) representa(n) cada uno halógeno, ciano, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, carbonilo que tiene
 10 hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente, o grupo heterocíclico insaturado;
 R² representa fenilo, piridilo o tienilo;
 R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y
 R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo.

15 Efectos ventajosos de la invención

La presente invención proporciona un nuevo método para predecir la eficacia terapéutica de los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR en un paciente de cáncer. Específicamente, el método de la presente invención hace posible predecir, basándose en la expresión de PIK3C2B, si un paciente de cáncer muestra claramente sensibilidad a los
 20 inhibidores de PI3K/AKT/mTOR. Esto permite la selección de fármacos adecuados y la prevención de medicación innecesaria en tratamientos de cáncer, permitiendo por tanto la planificación de un régimen de dosificación adecuado o el cambio a un régimen de dosificación adecuado.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La Fig. de referencia 1 muestra una correlación entre el nivel de expresión de PHLDA1 o PIK3C2B y la sensibilidad a los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR.
 La Fig. de referencia 2 muestra los resultados del análisis de la atenuación del gen PHLDA1, el nivel de expresión de la proteína y el estado fosforilado.
 30 La Fig. 3 muestra los resultados del análisis del cambio en la sensibilidad a los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR provocados por la atenuación del gen PIK3C2B.
 La Fig. 4 muestra una comparación de la medición del nivel de expresión de PHLDA1/PIK3C2B con la medición convencional de la mutación de PIK3CA/deleción de PTEN en la eficacia terapéutica del inhibidor de PI3K/AKT/mTOR que predice el rendimiento.

Descripción de las realizaciones

El método de predicción de acuerdo con la presente invención es para predecir o probar la eficacia terapéutica de una quimioterapia utilizando un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR en un paciente
 40 de cáncer basándose en el nivel de expresión de PIK3C2B en una muestra biológica que contiene células tumorales aisladas del paciente de cáncer.

Los ejemplos específicos de cánceres dirigidos en la presente invención incluyen cáncer de cabeza y cuello, cáncer de órganos digestivos (cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer duodenal, cáncer de hígado, cáncer biliar
 45 (por ejemplo, cáncer de vesícula biliar y de conductos biliares), cáncer de páncreas, cáncer de intestino delgado, cáncer de intestino grueso (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de colon y cáncer rectal), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero (por ejemplo, cáncer de cuello de útero y cáncer de endometrio), cáncer de riñón, cáncer de vejiga y cáncer de próstata. El "cáncer", como se utiliza en el presente documento, incluye no solo tumores primarios, sino
 50 también tumores diseminados a otros órganos (por ejemplo, hígado). El "paciente de cáncer", como se utiliza en el presente documento, incluye no solo a los pacientes que actualmente tienen células tumorales, sino también a los pacientes en los que las células tumorales desaparecieron o se volvieron indetectables mediante tratamientos tales como operaciones quirúrgicas y quimioterapia.

55 El "inhibidor de PI3K/AKT/mTOR" de acuerdo con la presente divulgación no está particularmente limitado, siempre que el inhibidor sea un fármaco que tenga una actividad inhibidora contra la hiperactividad de señalización en la ruta

- de señalización de PI3K/AKT/mTOR. Entre los ejemplos se incluyen inhibidores que se dirigen a una o dos o más moléculas seleccionadas del grupo que consiste en PI3K, AKT y mTOR. El inhibidor es preferentemente un inhibidor de PI3K, un inhibidor de AKT, un inhibidor de mTOR o un inhibidor dual de PI3K-mTOR. Estos inhibidores pueden tener adicionalmente actividad inhibidora contra moléculas diana distintas de PI3K, AKT y mTOR. El término "inhibidor", como se utiliza en el presente documento, incluye no solo fármacos para inhibir la actividad de moléculas diana, sino también fármacos para inhibir la expresión de moléculas diana. El modo del inhibidor de PI3K/AKT/mTOR no está particularmente limitado y entre los ejemplos se incluyen compuestos de bajo peso molecular, anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, ARNip y aptámeros.
- Los ejemplos específicos de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR incluyen compuestos de imidazo-oxazina representados por la fórmula (I) y sus sales. Los compuestos de imidazo-oxazina representados por la fórmula (I) son útiles como un inhibidor de la enzima AKT.
- En la Fórmula (I), A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente o uno o dos de los así definidos A, B, C y D se reemplazan por nitrógeno.
- Entre los ejemplos de halógenos representados por R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} o R^{1d} se incluyen cloro, bromo, flúor y yodo y preferentemente cloro y flúor.
- El alquilo C₁₋₆ de "alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo" representado por R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} o R^{1d} es un alquilo lineal o ramificado que tiene un número de carbonos de 1 a 6, incluyendo metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, pentilo y hexilo, preferentemente alquilo C₁₋₃ y más preferentemente metilo. El número de grupos hidroxilo (sustituyentes) es de 0 a 2 y preferentemente 0 o 1.
- El "alcoxi C₁₋₆" representado por R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} o R^{1d} es un alcoxi lineal o ramificado que tiene un número de carbonos de 1 a 6, incluyendo metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi y *tert*-butoxi, preferentemente alcoxi C₁₋₃ y más preferentemente metoxi y etoxi.
- El "carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente" representado por R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} o R^{1d} es carbonilo que tiene hidroxilo como un sustituyente (es decir, grupo carboxilo), carbonilo que tiene amino como sustituyente (es decir, carbamoilo), mono o di(alquil C₁₋₆)aminocarbonilo opcionalmente sustituido o mono o di(alcoxi C₁₋₆)aminocarbonilo.
- El "mono o di(alquil C₁₋₆)aminocarbonilo" de "mono o di(alquil C₁₋₆)aminocarbonilo opcionalmente sustituido" de "carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente" representado por R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} o R^{1d} es aminocarbonilo que tiene uno o dos grupos alquilo C₁₋₆ descritos anteriormente, preferentemente mono o di(alquil C₁₋₃)aminocarbonilo y más preferentemente metilaminocarbonilo, dimetilaminocarbonilo o etilaminocarbonilo. El sustituyente es preferentemente hidroxilo. El número de sustituyentes, si los contiene, preferentemente es uno.
- El mono o di(alcoxi C₁₋₆)aminocarbonilo es aminocarbonilo que tiene uno o dos grupos alcoxi C₁₋₆ descritos anteriormente, preferentemente mono o di(alcoxi C₁₋₃)aminocarbonilo y más preferentemente etoxiaminocarbonilo.
- El "carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente" representado por R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} o R^{1d} concretamente es preferentemente carboxilo, carbamoilo, metilaminocarbonilo, etilaminocarbonilo, hidroxietilaminocarbonilo o etoxiaminocarbonilo.
- El "grupo heterocíclico insaturado" representado por R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} o R^{1d} es un grupo heterocíclico insaturado monocíclico o bicíclico de 5 a 10 miembros que tiene de uno a cuatro heteroátomos de cualquiera de N, S y O. Entre los ejemplos se incluyen imidazolilo, tienilo, furilo, pirrolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, pirazilo, pirimidinilo, piridazinilo, indolilo, isoindolilo, indazolilo, benzofuranilo, benzoimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, purinilo, quinolilo, isoquinolilo, quinotiazolilo y quinoxalilo, siendo preferible pirazolilo.
- Los ejemplos específicos de compuestos de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) incluyen los siguientes compuestos (a) a (t).
- (a) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-fluoro-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (b) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-fluoro-3-(piridin-4-il)-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (c) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il) fenil)ciclobutanol,
 (d) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (e) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4(9-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (f) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4(8-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (g) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (h) trans-3-amino-1-metil-3-(4(3-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,

- (i) trans-3-amino-1-etil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (j) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (k) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol (en lo sucesivo denominado "Compuesto I"),
- (l) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[4,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (m) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[4,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (n) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,2-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (o) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirazino[2,3-e][1,3]oxazina-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (p) trans-3-amino-3-(4-(9-(hidroximetil)-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)-1-metilciclobutanol,
- (q) 2-(4-trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-9-carbonitrilo,
- (r) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-9-(1H-pirazol-5-il)-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (s) 2-(4-(trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-N-metil-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-8-carboxamida y
- (t) 2-(4-(trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-N-etoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-8-carboxamida

Entre los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de imidazo-oxazina representados por la fórmula (I) se incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico; sales de adición de ácido formadas con ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido pícrico, ácido metanosulfónico, ácido para-toluensulfónico y ácido glutámico; sales formadas con bases inorgánicas, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y aluminio; sales formadas con bases inorgánicas, tales como metilamina, etilamina, meglumina y etanol amina; sales formadas con aminoácidos básicos, tales como lisina, arginina y ornitina; y sales de amonio de las mismas. Los compuestos de imidazo-oxazina representados por la fórmula (I) incluyen enantiómeros e hidratos.

Los compuestos de imidazo-oxazina representados por la fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden producir de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO2012/137870.

Los ejemplos específicos de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR son como sigue: los ejemplos específicos de inhibidores de PI3K incluyen AMG-319, AZD-6482, BYL-719, copanlisib (BAY-80-6946), GDC-0032, GDC-0084, GSK-1059615, GSK-2126458, GSK-2636771, idelalisib (CAL-101), IPI-145, MLN-1117 (INK-1117), PA-799 (CH-5132799), pictilisib (GDC-0941), pilaralisib (XL-147), SF-1126, sonolisib (PX-866) y voxalisib (SAR-245409, XL-765); los ejemplos específicos de inhibidores de AKT incluyen clorhidrato de afuresertib (GSK-2110183), ARQ-092, AZD5363, clorhidrato de enzastaurina, GDC-0068, GSK-2141795, GSK690693, LY-2780301, MK-2206, perifosina y fosfato de triciribina (VQD-002); los ejemplos específicos de inhibidores de mTOR incluyen AZD-2014, AZD-8055, CC-115, CC-223, DS-3078, everolimus, temsirolimus, ME-344, MLN-0128 (INK-128), OSI-027, PWT-33597, ridaforolimus y sirolimus; y los ejemplos específicos de inhibidores duales de PI3K-mTOR dual incluyen dactolisib (BEZ235), DS-7423, GDC-0980, NVP-BGT-226, PF-04691502, PF-05212384 (PKI-587) y PWT-33597. Estos inhibidores están disponibles comercialmente y también se pueden producir de acuerdo con un procedimiento conocido normalmente.

De los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR mencionados anteriormente, MK-2206, BEZ235, GDC-0941, sirolimus y trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol son más preferibles y trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol es particularmente preferible desde el punto de vista de los efectos de estratificación por PIK3C2B.

La forma de dosificación del agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR de acuerdo con la presente divulgación no está particularmente limitada y puede seleccionarse adecuadamente de formas de dosificación conocidas normalmente dependiendo del tipo de inhibidor de PI3K/AKT/mTOR. Los ejemplos específicos incluyen fármacos orales (por ejemplo, comprimidos, comprimidos recubiertos, medicamento en polvo, medicamento granular, cápsulas y medicamento líquido), fármacos inyectables, supositorios, parches y pomadas. El agente antitumoral se puede preparar de acuerdo con un procedimiento conocido normalmente utilizando un vehículo aceptable farmacológicamente dependiendo de la forma de dosificación. Entre los ejemplos de vehículos se incluyen aquellos que se utilizan ampliamente en fármacos típicos, tales como excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, diluyentes, agentes solubilizantes, agentes de suspensión, agentes de tonicidad, ajustadores de pH, tampones, estabilizantes, colorantes, agentes aromatizantes y agentes enmascaradores de olores.

La "quimioterapia que utiliza un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR" de la presente divulgación se refiere a una quimioterapia en la que se administra al menos un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR de acuerdo con la presente divulgación. La quimioterapia incluye no solo quimioterapia individualmente que utiliza el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR, sino

también quimioterapia que utiliza el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR en combinación con uno u otros más agentes antitumorales.

5 La cantidad de inhibidor de PI3K/AKT/mTOR contenida en el agente antitumoral varía dependiendo de los síntomas del paciente que se va a tratar con el agente, la forma de dosificación del agente o similares. Sin embargo, la cantidad preferible del inhibidor de PI3K/AKT/mTOR por forma de dosificación unitaria es normalmente de aproximadamente 0,05 a 1000 mg para un fármaco oral, de aproximadamente 0,01 a 500 mg para un fármaco inyectable y de aproximadamente 1 a 1000 mg para un supositorio. La dosis diaria del agente antitumoral en las formas de dosificación anteriormente descritas varía dependiendo de los síntomas, el peso corporal, la edad, el sexo y otros factores del paciente y por tanto no puede determinarse incondicionalmente. Sin embargo, la dosis diaria del agente para un adulto (peso corporal: 50 kg) puede ser normalmente de aproximadamente 0,05 a 5000 mg y preferentemente de 0,1 a 1000 mg y el agente en tal cantidad se administra preferentemente en una sola dosis o en dos o tres dosis divididas por día.

15 La pauta de dosificación de la quimioterapia se determina adecuadamente de acuerdo con las condiciones tales como el tipo de inhibidor de PI3K/AKT/mTOR, la presencia o ausencia de un fármaco coadministrado, el historial de tratamiento, el estadio de la enfermedad, la presencia o ausencia de metástasis y la edad y el sexo del paciente.

20 La quimioterapia no hace distinción respecto a si la cirugía para extirpar un tumor se realiza durante la quimioterapia o antes o después de la quimioterapia. La quimioterapia puede ser cualquiera de las siguientes: quimioterapia que no implica la extirpación del tumor destinada en gran medida a prolongar la vida; quimioterapia adyuvante preoperatoria que implica la extirpación de un tumor que se ha contraído después de la quimioterapia destinada en gran medida a un efecto de contracción del tumor; y quimioterapia adyuvante posoperatoria proporcionada con fines preventivos después de la extirpación de un tumor destinada en gran parte a suprimir la recaída o la metástasis.

25 La "eficacia terapéutica" en la presente invención puede evaluarse mediante los efectos de contracción del tumor, los efectos de supresión de la recaída o de la metástasis, los efectos de prolongación de la vida y otros efectos como se ha descrito anteriormente. La expresión "es probable que el paciente responda suficientemente a la quimioterapia utilizando el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR" indica que la eficacia terapéutica en un paciente que muestra un nivel alto de expresión de PIK3C2B es marcadamente superior a la eficacia terapéutica en un paciente que muestra un bajo nivel de expresión de PIK3C2B, con la superioridad demostrada por una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

30 La muestra biológica de la presente invención no está particularmente limitada, siempre que la muestra se aísle de un paciente de cáncer y contenga células tumorales. Entre los ejemplos se incluyen fluidos corporales (por ejemplo, sangre, orina y cabello del cuero cabelludo), tejidos (por ejemplo, muestras de tejido de biopsia y órganos extirpados), los extractos de los mismos y los cultivos de los mismos. El método para aislar una muestra biológica se puede seleccionar de forma adecuada dependiendo del tipo de muestra biológica.

40 PHLDA1 (dominio similar a la homología de pleckstrina familia A miembro 1; del inglés, Pleckstrin Homology-Like Domain family A member 1), un indicador de la presente divulgación, es un tipo de nucleoproteína que tiene un dominio de homología de pleckstrina y se ha notificado que está asociado con la acción antiapoptótica de los factores de crecimiento de similares a insulina. Se desconoce la asociación de PHLDA1 con la ruta de PI3K/AKT/mTOR.

45 PIK3C2B (fosfatidilinositol-4-fosfato 3-quinasa, subunidad catalítica tipo 2 beta), un indicador de la presente invención, se incluye en la superfamilia PI3K. Sin embargo, a diferencia de PIK3CA, cuya asociación con los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR se ha notificado, PIK3C2B es un miembro de la familia de PI3K clase II y no tiene subunidad reguladora.

50 En el método de predicción según la presente invención, no existen restricciones concretas sobre lo que se mide para medir el nivel de expresión, siempre que el nivel de expresión pueda medirse cuantitativa o semicuantitativamente. Entre los ejemplos se incluyen el nivel de expresión de ARNm, el número de copias de ADN y el nivel de expresión de proteínas.

55 El nivel de expresión de ARNm, cuando se selecciona para la medición, se puede medir utilizando una sonda o un cebador que hibrida específicamente con el ARNm de PIK3C2B de acuerdo con una técnica utilizada convencionalmente para medir el nivel de expresión de ARNm, como transferencia Northern, RT-PCR, PCR en tiempo real, micromatriz de ADN e hibridación *in situ*.

60 El número de copias de ADN, cuando se selecciona para la medición, se puede medir utilizando una sonda que hibrida específicamente con el ADN de PIK3C2B de acuerdo con una técnica utilizada convencionalmente para medir el número de copias de ADN, tal como la hibridación *in situ*, matriz CGH, micromatriz de ADN y transferencia de Southern.

65 El nivel de expresión de la proteína, cuando se selecciona para la medición, puede medirse utilizando un anticuerpo

que reconoce específicamente la proteína de PIK3C2B de acuerdo con un inmunoensayo utilizado convencionalmente, tal como ELISA, transferencia Western y tinción inmunohistoquímica.

El cebador y la sonda en la presente invención se pueden producir como un polinucleótido que hibrida específicamente con el ADN o el ARNm de PIK3C2B humano basándose en la información de la secuencia de bases conocida del ADN o ARNm de PIK3C2B humano (ADN de PIK3C2B humano: GenBankID NC_000001.10, ARNm: GenBankID NM_002646) de acuerdo con una técnica conocida normalmente. La longitud del cebador es de 10 a 50 bases, preferentemente de 15 a 50 bases y más preferentemente de 18 a 35 bases. La longitud de la sonda es de 15 bases de la longitud de bases total, preferentemente 20 bases de las bases totales y más preferentemente 30 bases de la longitud de bases total.

El cebador y la sonda no tienen necesariamente que tener una complementariedad perfecta, siempre que puedan hibridar específicamente con el ADN o el ARNm de PIK3C2B. El cebador y la sonda son cada uno un polinucleótido que tiene al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 %, todavía más preferentemente al menos un 95 % y concretamente más preferentemente al menos un 98 % de identidad con la secuencia de bases correspondiente.

La expresión "hibrida específicamente" en la presente invención significa que, en condiciones de hibridación rigurosas, se forma un híbrido específico y no se forma un híbrido no específico. Las condiciones de hibridación rigurosas se pueden determinar basándose en la temperatura de fusión (T_f ; en inglés, T_m) del ácido nucleico que forma un híbrido de acuerdo con un procedimiento conocido normalmente. Los ejemplos específicos de condiciones de lavado que pueden mantener el estado hibridado normalmente incluyen las condiciones sustancialmente de "1×SSC, SDS al 0,1 %, 37 °C", más estrictamente las condiciones sustancialmente de "0,5×SSC, SDS al 0,1 %, 42 °C", y todavía más estrictamente las condiciones sustancialmente de "0,1×SSC, SDS al 0,1 %, 65 °C".

La sonda o cebador puede marcarse con una sustancia radiactiva, sustancia fluorescente, sustancia quimioluminiscentes o enzima utilizada normalmente para una fácil detección.

El anticuerpo de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que el anticuerpo pueda reconocer específicamente la proteína de PIK3C2B. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal y puede ser un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab y un fragmento $F(ab')_2$. El anticuerpo se puede producir de acuerdo con un procedimiento conocido normalmente (por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987), Edit. John Wiley and Sons. Sección 11.12-11.13) basado en la información de la secuencia de aminoácidos conocida de la proteína de PIK3C2B humana (PIK3C2B humana GenBankID NP_002637). Como alternativa, también se pueden utilizar anticuerpos disponibles comercialmente. Entre los ejemplos de anticuerpos anti-PIK3C2B humano se incluyen Abcam N.º de cat. ab55589 y Abgent N.º de cat. AP3309a.

En el método de predicción de la presente invención, cuando se observa un alto nivel de expresión de PIK3C2B en las células tumorales de un paciente de cáncer, se predice que es probable que el paciente de cáncer responda suficientemente a una quimioterapia utilizando un agente antitumoral que comprenda un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR.

El "bajo nivel de expresión de PHLDA1" como se utiliza en el presente documento indica que el nivel de expresión de PHLDA1 en un paciente es relativamente más bajo entre los de todos los pacientes de cáncer; más específicamente, el nivel de expresión de PHLDA1 es igual o menor que un punto de corte predeterminado.

El punto de corte como se utiliza en el presente documento varía dependiendo de diversas condiciones, tales como el tipo de objeto que se va a medir y el tipo de método de medición. Por tanto, un punto de corte puede no estar limitado a un valor concreto. Puede determinarse un punto de corte específico de acuerdo con diversas técnicas de análisis estadístico utilizando niveles de expresión premedidos de PHLDA1 de pacientes de cáncer. Entre los ejemplos de puntos de corte se incluyen el valor de la media o la mediana de los niveles de expresión de PHLDA1 de pacientes de cáncer; y un punto de corte que divide a los pacientes en grupos de expresión de PHLDA1 baja y alta y que es un valor en el que el valor p de la prueba del rango logarítmico realizada para la eficacia terapéutica (por ejemplo, período de supervivencia) de los grupos de expresión de PHLDA1 baja y alta es mínimo o menor que un cierto nivel (por ejemplo, un valor en donde el valor p es menor que 0,1 o un valor en el que el valor p es menor que 0,05).

La expresión "alto nivel de expresión de PIK3C2B" indica que el nivel de expresión de PIK3C2B en un paciente es relativamente más alto entre los de todos los pacientes de cáncer; más específicamente, el nivel de expresión de PIK3C2B es igual o superior a un punto de corte predeterminado. El punto de corte se puede determinar de la misma manera que en el nivel de expresión de PHLDA1 descrito anteriormente. Es preferible el valor de la media o la mediana de los niveles de expresión de PIK3C2B de los pacientes de cáncer y es más preferible el valor de la media de los niveles de expresión de PIK3C2B de los pacientes de cáncer.

La presente divulgación también proporciona un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR

para el tratamiento de un paciente de cáncer que se predice o se determina que es probable que responda suficientemente a una quimioterapia utilizando el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR mediante el método de predicción de acuerdo con la presente invención.

5 La presente divulgación también proporciona el uso de dicho agente antitumoral.

El agente antitumoral de acuerdo con la presente divulgación puede ir acompañado también de un manual de instrucciones, un manual de procedimiento o similar, que describa el procedimiento para practicar el método de predicción de acuerdo con la presente invención.

10 La presente divulgación también proporciona un kit para predecir o probar la eficacia terapéutica de una quimioterapia utilizando el agente antitumoral de acuerdo con la presente divulgación en un paciente de cáncer. El kit, de acuerdo con la presente divulgación, se utiliza adecuadamente con el fin de predecir o probar, mediante el método de predicción de acuerdo con la presente divulgación, la eficacia terapéutica de una quimioterapia.

15 Para medir el nivel de expresión de PHLDA1 y/o PIK3C2B mediante la cuantificación de ADN o ARNm en una muestra biológica que contiene células tumorales aisladas de un paciente de cáncer, el kit de la presente divulgación puede comprender un cebador y/o sonda que es un polinucleótido que hibrida específicamente con ADN o ARNm del PHLDA1 humano o PIK3C2B humano.

20 Para medir un nivel de expresión de PHLDA1 y/o PIK3C2B mediante la cuantificación de proteína (enzima) en una muestra biológica que contiene células tumorales aisladas del paciente, el kit de la presente divulgación puede comprender un anticuerpo (anticuerpo primario) contra PHLDA1 y/o PIK3C2B (enzima) y el anticuerpo secundario contra el anticuerpo primario, estando el anticuerpo secundario preferentemente marcado con un marcador de luciferasa, un marcador radioactivo, un marcador de fluorescencia o un marcador de enzimas.

El kit de la presente divulgación puede comprender además un manual de instrucciones o un manual de procedimiento que describa el procedimiento para practicar el método de predicción de acuerdo con la presente invención.

30 Ejemplos

Ejemplo 1

35 Correlación entre el nivel de expresión de PHLDA1 o PIK3C2B y la sensibilidad al inhibidor de PI3K/AKT/mTOR

Se realizó un ensayo de citotoxicidad como se describe a continuación utilizando 37 líneas celulares de cáncer de mama humano (AU565, BT20, BT474, BT549, CAMA-1, DU4475, HCC1187, HCC1419, HCC1428, HCC1500, HCC1569, HCC1599, HCC1806, HCC1937, HCC1954, HCC202, HCC2218, HCC38, HCC70, MDA-MB-157, MDA-MB-175, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468, UACC-812 y UACC-893 (todas obtenidas de la colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; del inglés, American Type Culture Collection); MCF-7, SK-BR-3, T47D y ZR-75-1 (todas obtenidas de Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.); KPL-1, KPL-3C y KPL-4 (proporcionadas por el Dr. Kurebayashi de la Kawasaki Medical School)). Cada línea celular se sembró en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos en una cantidad de 150 μ l y se cultivó en una incubadora que contenía gas dióxido de carbono al 5 % a 37 °C durante un día. Los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR (inhibidor de AKT: Compuesto-I, MK-2206, Inhibidor dual de PI3K-mTOR: BEZ235, inhibidor de PI3K: GDC-0941, inhibidor de mTOR: sirolimus) diluidos escalonadamente con dimetilsulfóxido, paclitaxel diluido escalonadamente con dimetilsulfóxido y dimetilsulfóxido se añadieron individualmente a los medios respectivos para las líneas celulares. Se añadieron 50 μ l de cada medio a los pocillos de la microplaca de fondo plano de 96 pocillos antes mencionada, de manera que la concentración final de cada fármaco fue de 10.000, 3.000, 1.000, 300, 100, 30, 3 y 1 nM. Una microplaca de fondo plano de 96 pocillos preparada por separado en la que se cultivó cada línea celular durante un día se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se retiraron 50 μ l del sobrenadante de cada pocillo para dejar 100 μ l de la solución de cultivo celular. Para cada pocillo que contiene los 100 μ l restantes de la solución de cultivo celular, se añadió la misma cantidad de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, N.º de cat. G7573). Se dejó reposar la microplaca en un lugar oscuro durante 10 minutos y a continuación se midió la intensidad de luminiscencia de las células vivas de cada pocillo al que se añadió el fármaco utilizando un lector de microplacas (PerkinElmer, ARVOsx). Las líneas celulares a las que se añadió un fármaco o solo dimetilsulfóxido se cultivaron adicionalmente a 37 °C en una incubadora que contenía gas dióxido de carbono al 5 % durante 3 días. Tras el cultivo, las líneas celulares se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se retiraron 100 μ l del sobrenadante de cada pocillo para dejar 100 μ l de la solución de cultivo celular. A los 100 μ l restantes de solución de cultivo celular, se añadió la misma cantidad de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo. Se dejó reposar la microplaca en un lugar oscuro durante 10 minutos y a continuación se midió la intensidad de luminiscencia de las células vivas de cada pocillo utilizando un lector de microplacas. La tasa de crecimiento celular de las 37 líneas celulares de cáncer de mama humano se determinó de acuerdo con las siguientes ecuaciones y la concentración a la que la tasa de crecimiento celular es del 50 %, es decir, se determinó la concentración (GI₅₀; (μ M)) de cada fármaco en la que el crecimiento celular se suprime en un 50 %.

Cuando $T \geq C_0$, la Tasa de crecimiento celular (%) = $(T - C_0) / (C - C_0) \times 100$

Cuando $T < C_0$, la Tasa de crecimiento celular (%) = $(T - C_0) / C_0 \times 100$

C_0 : La intensidad de luminiscencia en un pocillo que contiene medios con células antes de que se añada un fármaco (recuento por segundo)

C: La intensidad de luminiscencia en un pocillo que contiene medios con células a las que solo se añadió dimetilsulfóxido (recuento por segundo)

T: La intensidad de la luminiscencia en un pocillo que contiene medios con células a las que se añadió un fármaco a analizar (recuento por segundo)

Posteriormente, se midió el nivel de expresión de PHLDA1 y PIK3C2B en las 37 líneas celulares de cáncer de mama humano. Cada línea celular se cultivó en una placa de cultivo celular de 10 cm hasta que se logró aproximadamente un 50 a 80 % de confluencia y el ARN total se extrajo utilizando un Mini Kit RNeasy (Qiagen, N.º de cat. 74106) de acuerdo con el manual de instrucciones. La concentración y pureza del ARN total extraído se examinaron utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific). La degradación también se examinó utilizando un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). El ARN total extraído se transcribió de forma inversa en ADNc utilizando un kit GeneChip 3 'IVT Express (Affymetrix) y a continuación, se transcribió adicionalmente en ARNc biotinilado. Posteriormente, se fragmentó el ARNc biotinilado amplificado (20 µg). Cada operación se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento del manual de instrucciones incluido con el kit. El ARNc biotinilado obtenido de cada línea celular como un espécimen se añadió a una matriz GeneChip Human Genome U-133 Plus 2.0 (Affymetrix, ID del conjunto de sondas PIK3C2B: 204484_at, ID del conjunto de sondas PHLDA1: 217997_at) y a continuación, se colocó en un horno de hibridación GeneChip 640 (Affymetrix), seguido de hibridación a 45 ° C a 60 rpm durante 16 horas. Después de la hibridación, cada muestra se lavó y se marcó con fluorescencia utilizando un GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) y a continuación, se escaneó utilizando un GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) para obtener datos de micromatrices. El análisis de los datos de micromatrices se realizó utilizando MATLAB (MathWorks). El nivel de expresión génica se determinó mediante la técnica RMA (Robust Multi-array Average).

La Fig. 1 muestra la correlación de Pearson entre el logaritmo del GI_{50} obtenido anteriormente de cada fármaco y el logaritmo del nivel de expresión de PHLDA1 y PIK3C2B.

Los resultados revelan que todos los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR examinados tuvieron una correlación positiva estadísticamente significativa con el nivel de expresión de PHLDA1 y también tuvieron una correlación negativa estadísticamente significativa con el nivel de expresión de PIK3C2B. El paclitaxel, sin embargo, no mostró una correlación con el nivel de expresión de PHLDA1 o PIK3C2B. Específicamente, los resultados indican que el nivel de expresión de PIK3C2B y PHLDA1 puede ser un marcador predictivo de sensibilidad para una amplia gama de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR.

También se examinó si el nivel de expresión de PHLDA1 o PIK3C2B tiene una correlación con la sensibilidad a los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR en un panel de 240 líneas celulares (OncoPanel™, Ricerca Biosciences) compuestas por varios cánceres, tales como cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de intestino grueso, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de sangre y linfoma maligno. Los resultados revelaron que, como en las 37 líneas celulares de cáncer de mama humano, hubo una correlación significativa entre el logaritmo del GI_{50} de una amplia gama de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR (Compuesto-I, MK-2206, BEZ235, GDC -0941 y sirolimus) y el logaritmo del nivel de expresión de PHLDA1 y PIK3C2B en el panel de 240 líneas celulares.

Ejemplo de referencia 2

Análisis de la atenuación del gen PHLDA1, nivel de expresión de la proteína y estado fosforilado

Se atenuó el gen PHLDA1 para examinar el estado fosforilado de AKT y se analizó la relación entre PHLDA1 y la ruta de señalización de PI3K/AKT/mTOR.

Tres líneas celulares de cáncer de mama (HCC38, HCC1806, HCC1937; todas obtenidas de la colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC)), que mostraron una expresión relativamente alta de PHLDA1, se cultivaron en un medio RPMI (Life Technologies Corp., N.º de cat. A104910-01) que contiene FBS al 10 %.

Se prepararon ARNip de control negativo (CN) (agrupación de control ON-TARGET Plus, Thermo Fisher Scientific, N.º D-001810-10-20) y PHLDA1-ARNip (ON-TARGET Plus siRNA Human PHLDA1, Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. J-012389-08) para las líneas celulares a una concentración final de 10 nM. El ARNip se introdujo en las células utilizando Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, N.º de cat. 13778-150) de acuerdo con el manual de instrucciones para atenuar el gen. Después de la atenuación de 3 días, las líneas celulares se lavaron con PBS frío (Life Technologies, N.º de cat. 10010-023) dos veces y un tampón solubilizado (PhosSTOP (Roche, N.º de cat. 4906837), cOMplete y un tampón Pierce RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 89901)) que no contiene EDTA (Roche, N.º de cat. 1873580) se añadieron a las líneas celulares lavadas, seguido de enfriamiento con hielo durante 30 minutos para la solubilización. Los extractos solubilizados se centrifugaron a 4 ° C y 15.000 rpm durante

30 minutos para recoger los sobrenadantes, dando de este modo extractos de proteínas. Se midió la concentración de proteína de los extractos de proteínas obtenidos utilizando un reactivo de ensayo de proteína BCA (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 23225) de acuerdo con el manual de instrucciones. Se añadió un tampón reductor (ImmunoPure Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 39000)) a los extractos de proteínas y los extractos se hirvieron y de ese modo se modificaron. Se aplicaron 20 µg de cada extracto de proteínas reducido a los geles prefabricados Criterion TGX (Bio-Rad, N.º de cat. 567-1084) por carril y se realizó una SDS-PAGE.

Después de completar la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a las respectivas membranas de PVDF (Trans-Blot Turbo Midi PVDF Transfer Pack, Bio-Rad, N.º de cat. 170-4157) utilizando un aparato de transferencia (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad). Las membranas transferidas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora para realizar el bloqueo con Blocking One-P (Nacalai, N.º de cat. 05999-84). Posteriormente, las membranas se hicieron reaccionar, a 4 °C durante la noche, con un anticuerpo anti-PHLDA1 humano de cabra (Santa Cruz, N.º de cat. Sc-6142) y un anticuerpo anti-AKT fosforilada humana de conejo (S473) (Cell Signaling Technology, N.º de cat. 4060) que se había diluido de antemano 1.000 veces y 2.000 veces, respectivamente, con un tampón TBS ("TBS-T") que contenía BSA al 5 % y Tween20 al 0,05 %. Las membranas de PVDF se lavaron con TBS-T tres veces a temperatura ambiente durante 10 minutos y a continuación, se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora con anticuerpos secundarios (un anticuerpo anti-cabra (Santa Cruz, N.º de cat. Sc-2020) y un anticuerpo anti-conejo (GE Healthcare, N.º de cat. NA9340V) que se habían marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP)) diluida 2.000 veces con leche desnatada al 5 %/TBS-T. Las membranas de PVDF se lavaron con TBS-T tres veces a temperatura ambiente durante 10 minutos y a continuación, se detectó la quimioluminiscencia con LAS-3000 (Fujifilm) utilizando un reactivo de detección de transferencia Western ECL Prime (GE Healthcare, N.º de cat. RPN2232). La Fig. 2 muestra los resultados.

Como se muestra en la Fig. 2, en las tres líneas celulares de cáncer de mama que muestran una expresión alta de PHLDA1, la atenuación del gen PHLDA1 (KD, del inglés, knockdown) condujo a un aumento en la fosforilación de AKT (S473), así como a la activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT/mTOR. Debido a que el nivel de fosforilación de AKT (S473) se correlaciona con los efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* de los inhibidores de PI3K (Cancer Research 70, 4982-4994 (2010)), los resultados indican que el nivel de expresión de PHLDA1 puede asociarse con la eficacia terapéutica de los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR.

Ejemplo 3

Análisis del cambio en la sensibilidad al inhibidor de PI3K/AKT/mTOR causado por la atenuación del gen PIK3C2B

Se cultivó una línea celular de cáncer de ovario humano OVCAR-3 (obtenida de ATCC) en un medio RPMI (Life Technologies Corp., N.º de cat. A104910-01) que contiene FBS al 20 % y 0,01 mg/ml de insulina bovina (Sigma-Aldrich, N.º de cat. 10516). Se cultivó una línea celular de cáncer de mama humano HCC1187 (obtenida de ATCC) en un medio RPMI (Life Technologies Corp., N.º de cat. A104910-01) que contiene FBS al 10 %.

Se ensayó la citotoxicidad de los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR (inhibidor de AKT: Compuesto-I, inhibidor de PI3K: GDC-0941) y paclitaxel para las líneas celulares de acuerdo con el Ejemplo 1. La figura 3 muestra el recuento celular relativo de las líneas celulares tratadas con fármacos de diferentes concentraciones, asumiendo que el recuento celular de las células de control (dimetilsulfóxido añadido) cultivadas durante tres días es 100 y la ausencia de células es 0.

Como se muestra en la Fig. 3, en las líneas celulares OVCAR-3 y HCC1187, la atenuación del gen PIK3C2B condujo a una disminución de la sensibilidad al Compuesto-I y GDC-0941, que son inhibidores de PI3K/AKT/mTOR. Sin embargo, casi no se observaron cambios en la sensibilidad al paclitaxel, el cual no es un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR. Específicamente, los resultados revelan que PIK3C2B es un factor determinante que puede regular por sí solo la sensibilidad de las células cancerosas a un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR.

Ejemplo 4

Comparación de la medición del nivel de expresión de PHLDA1/PIK3C2B con la medición convencional de la mutación de PIK3CA/delección de PTEN en la eficacia terapéutica del inhibidor de PI3K/AKT/mTOR que predice el rendimiento

El nivel de expresión de PHLDA1 o PIK3C2B se comparó con la mutación de PIK3CA o la delección de PTEN, que se han examinado como un marcador predictivo de eficacia terapéutica en la práctica clínica, en términos de correlación con la sensibilidad a un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR.

De las 37 líneas celulares de cáncer de mama humano descritas en el Ejemplo 1, se sabe que 36 líneas celulares (se excluye KPL-3C) tienen mutación de PIK3CA o delección de PTEN. La Fig. 4 muestra el GI₅₀ (µM) del Compuesto-I para las 36 líneas celulares con la presencia o ausencia de la mutación de PIK3CA (E545K o H1047R) o delección de PTEN. La delección de PTEN (8 líneas celulares) no mostró una correlación con la sensibilidad al

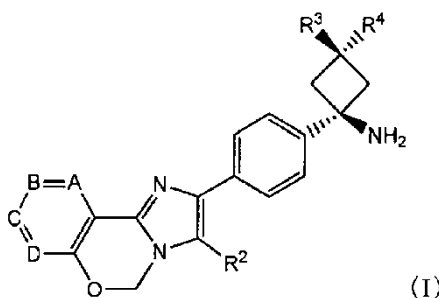
- Compuesto-I. La mutación de PIK3CA (10 líneas celulares) demostró una tendencia a correlacionarse con una alta sensibilidad al Compuesto-I, pero la correlación no fue significativa ($p=0,051$). Asimismo, se realizaron estudios sobre la asociación del nivel de expresión de PHLDA1 o PIK3C2B con la sensibilidad al Compuesto-I en las 37 líneas celulares de cáncer de mama humano. La figura 4 muestra, como un ejemplo, la distribución de GI_{50} (μM) del
- 5 Compuesto-I en el caso en donde el valor medio de los niveles de expresión de PHLDA1 o PIK3C2B se determinó como punto de corte y los niveles de expresión se dividieron en dos grupos. El nivel de expresión de cada PHLDA1 y PIK3C2B mostró una fuerte correlación con la sensibilidad al Compuesto-I ($p = 0,00061$ y $0,0060$).
- 10 El nivel de expresión de PHLDA1 o PIK3C2B claramente tiene una mayor correlación con la sensibilidad al Compuesto-I que las técnicas convencionales, la mutación de PIK3CA y la delección de PTEN y es útil como marcador predictivo de eficacia terapéutica en la práctica clínica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la eficacia terapéutica de una quimioterapia utilizando un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR en un paciente de cáncer basándose en un nivel de expresión de PIK3C2B en células tumorales aisladas del paciente de cáncer, que comprende las siguientes etapas (1) y (2):

(1) medir un nivel de expresión de PIK3C2B en una muestra biológica que contiene células tumorales aisladas del paciente; y

(2) predecir que es probable que el paciente responda suficientemente a la quimioterapia utilizando el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR cuando el nivel de expresión de PIK3C2B medido en la etapa (1) es igual o mayor que un punto de corte predeterminado; en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es un compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable



en la que

A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente, o uno o dos de los así definidos A, B, C y D son reemplazados por nitrógeno;

al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el otro o los otros representan cada uno halógeno, ciano, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquilo C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente, o un grupo heterocíclico insaturado;

R² representa fenilo, piridilo o tienilo;

R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y

R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo;

en donde el punto de corte predeterminado para el nivel de expresión de PIK3C2B es el valor de la media o de la mediana de los niveles de expresión de PIK3C2B de pacientes de cáncer o un valor en el que el valor *p* de la prueba del rango logarítmico realizada para la eficacia terapéutica es menor de 0,1.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) es un compuesto en donde A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente, o uno cualquiera o dos de los así definidos A, B, C y D son reemplazados por nitrógeno;

al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el otro o los otros representan cada uno cloro, flúor, ciano, metilo, hidroximetilo, metoxi, etoxi, carboxilo, carbamoilo, metilaminocarbonilo, etilaminocarbonilo, hidroxietilaminocarbonilo, etoxiaminocarbonilo o pirazolilo;

R² representa fenilo, piridilo o tienilo;

R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y

R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo.

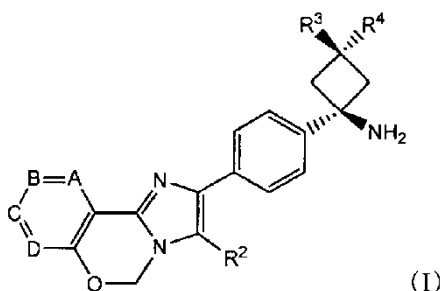
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) es cualquiera de los siguientes compuestos (a) a (t),

- (a) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-fluoro-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (b) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-fluoro-3-(piridin-4-il)-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (c) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (d) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(10-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (e) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(9-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (f) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(8-metoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (g) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (h) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (i) trans-3-amino-1-etil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[2,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (j) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
- (k) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,

- (l) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[4,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (m) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[4,3-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (n) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,2-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 (o) trans-3-amino-1-ciclopropil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirazino[2,3-e][1,3]oxazina-2-il)fenil)ciclobutanol,
 5 (p) trans-3-amino-3-(4-(9-(hidroximetil)-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)-1-metilciclobutanol,
 (q) 2-(4-trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-9-carbonitrilo,
 (r) trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-9-(1H-pirazol-5-il)-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol,
 10 (s) 2-(4-(trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-N-metil-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-8-carboxamida y
 (t) 2-(4-(trans-1-amino-3-hidroxi-3-metilciclobutil)fenil)-N-etoxi-3-fenil-5H-benzo[e]imidazo[1,2-c][1,3]oxazina-8-carboxamida.

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es trans-3-amino-1-metil-3-(4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil)ciclobutanol.

5. Un agente antitumoral para utilizar en el tratamiento de un paciente de cáncer, comprendiendo el agente antitumoral un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR y teniendo el paciente de cáncer células tumorales en las que un nivel de expresión de PIK3C2B es igual o mayor que un punto de corte predeterminado, en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es un compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable

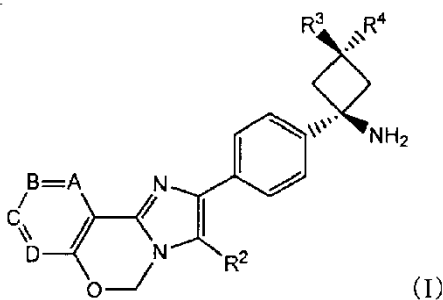


en la que

A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente, o uno o dos de los así definidos A, B, C y D son reemplazados por nitrógeno;
 al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el otro o los otros representan cada uno halógeno, ciano, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente, o un grupo heterocíclico insaturado;
 R² representa fenilo, piridilo o tienilo;
 R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y
 R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo;
 en donde el punto de corte predeterminado para el nivel de expresión de PIK3C2B es el valor de la media o de la mediana de los niveles de expresión de PIK3C2B de pacientes de cáncer o un valor en el que el valor *p* de la prueba del rango logarítmico realizada para la eficacia terapéutica es menor de 0,1.

6. Un agente antitumoral para utilizar en el tratamiento de un paciente de cáncer, que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR, administrándose el agente antitumoral a un paciente que se predice que es probable que responda suficientemente a una quimioterapia utilizando el agente antitumoral mediante un método que comprende las siguientes etapas (1) y (2):

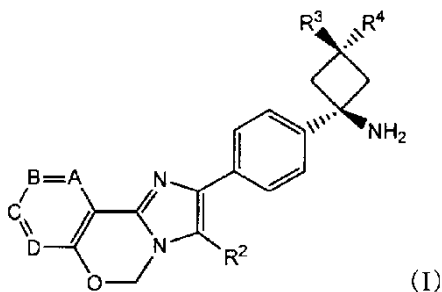
- (1) medir un nivel de expresión de PIK3C2B en una muestra biológica que contiene células tumorales aisladas del paciente; y
- (2) predecir que es probable que el paciente responda suficientemente a la quimioterapia utilizando el agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR cuando el nivel de expresión de PIK3C2B medido en la etapa (1) es igual o mayor que un punto de corte predeterminado, en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es un compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable



en la que

- 5 A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente, o uno o dos de los así definidos A, B, C y D son reemplazados por nitrógeno;
 al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el otro o los otros representan cada uno
 10 halógeno, ciano, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente, o un grupo heterocíclico insaturado;
 R² representa fenilo, piridilo o tienilo;
 R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y
 R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo;
 15 en donde el punto de corte predeterminado para el nivel de expresión de PIK3C2B es el valor de la media o de la mediana de los niveles de expresión de PIK3C2B de pacientes de cáncer o un valor en el que el valor *p* de la prueba del rango logarítmico realizada para la eficacia terapéutica es menor de 0,1.

7. Un agente antitumoral que comprende un inhibidor de PI3K/AKT/mTOR para utilizar en el tratamiento de un
 20 paciente de cáncer que se predice mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que es probable que responda suficientemente a una quimioterapia utilizando el agente antitumoral;
 en donde el inhibidor de PI3K/AKT/mTOR es un compuesto de imidazo-oxazina representado por la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable



25 en la que

- 30 A, B, C y D representan C-R^{1a}, C-R^{1b}, C-R^{1c} y C-R^{1d}, respectivamente, o uno o dos de los así definidos A, B, C y D son reemplazados por nitrógeno;
 al menos dos de R^{1a}, R^{1b}, R^{1c} y R^{1d} representan hidrógeno y el otro o los otros representan cada uno
 halógeno, ciano, alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, carbonilo que tiene hidroxilo, amino, mono- o di(alquil C₁₋₆)amino opcionalmente sustituido o mono- o di(alcoxi C₁₋₆)amino como un sustituyente, o un grupo heterocíclico insaturado;
 R² representa fenilo, piridilo o tienilo;
 35 R³ representa hidrógeno, metilo, etilo o ciclopropilo; y
 R⁴ representa hidrógeno o hidroxilo.

Fig. 1

PHLDA1			PIK3C2B		
Nombre del fármaco	valor p	r	Nombre del fármaco	valor p	r
Compuesto-I	9,1E-07	0,71	Compuesto-I	4,6E-06	-0,68
MK-2206	6,1E-05	0,61	MK-2206	1,5E-04	-0,58
BEZ235	4,2E-03	0,46	BEZ235	7,3E-03	-0,43
GDC-0941	9,3E-03	0,42	GDC-0941	6,5E-03	-0,44
Sirolimus	6,0E-05	0,61	Sirolimus	1,5E-03	-0,50
Paclitaxel	0,42	-0,14	Paclitaxel	0,80	-0,04

Fig. 2

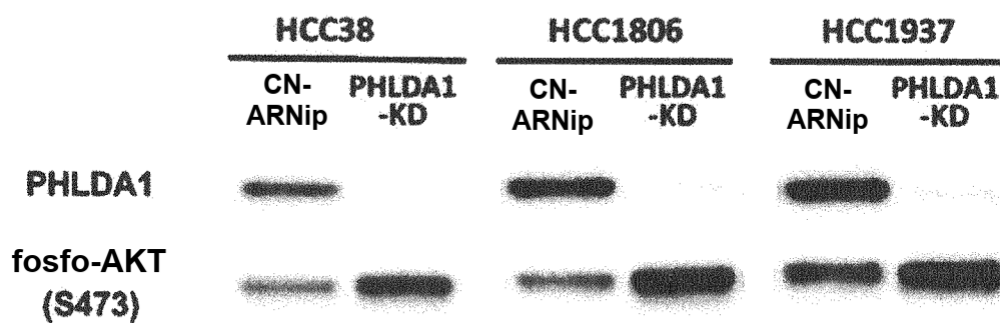


Fig. 3

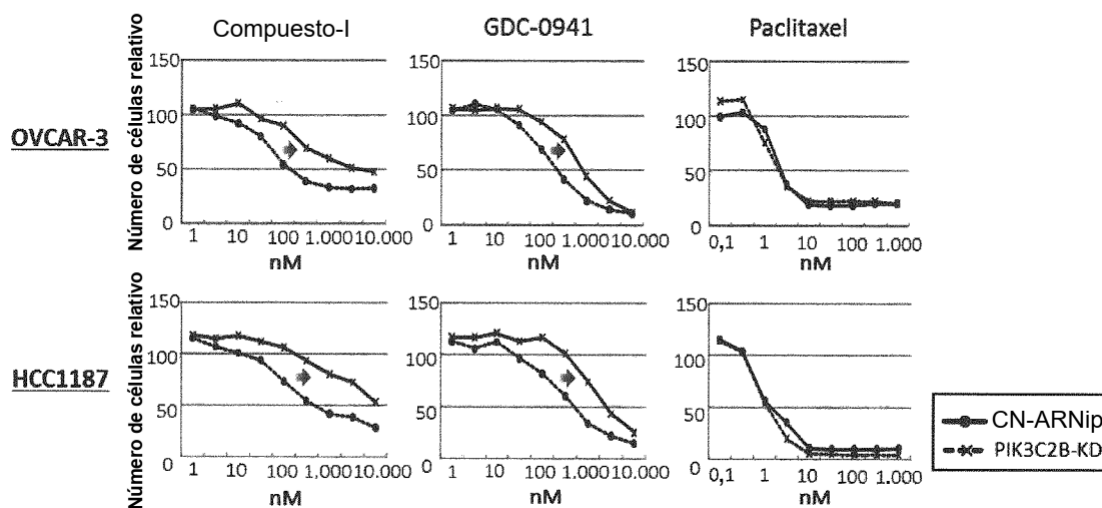


Fig. 4

