

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

**Aportación de los estudios farmacodinámicos en el desarrollo de
tratamientos dirigidos contra dianas moleculares de cascadas de
señalización proliferativas**

Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Josep María Taberneró Caturla

Director de la tesis:

Profesor José Manuel Baselga Torres. Catedrático.

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, Noviembre de 2012

[Certificado Dr. Baselga]

[Certificado de tesis por compendio de publicaciones]

A la meva dona Anna

Als meus fills Anna, Marc i Xènia

Als meus pares Josep Maria i Maria Teresa

A la fundació Cellex i en especial als Srs. Pere Mir i Jordi Segarra

A tots els meus companys per esperar

I per suposat a tots els malalts que desinteressadament van participar en aquests estudis i que com els altres malalts constitueixen el motiu del nostre ser i de les

nostres investigacions

Agradecimientos

Al Profesor José Manuel Baselga Torres, Director de esta tesis, por ser el responsable directo de mi inicio en la investigación en cáncer y por su contribución crítica en mi formación científica y carrera profesional académica. Por su generosidad y su confianza demostrada en mi persona para desarrollar una carrera académica y científica en una edad madura de mi carrera profesional. El ha sido mi verdadero mentor, con sus innumerables enseñanzas científicas y médicas, visión, apoyo permanente y capacidad de liderazgo continuado, con su tenacidad y dedicación por el trabajo. Sin él, esta tesis no habría sido posible.

A la Doctora Carmen Alonso, por enseñarme los principios de Oncología en mi etapa de residente, contribución a mi formación profesional como oncólogo clínico y apoyo continuado personal.

Al Profesor Joan Borrás, por su amistad personal incondicional y por su apoyo continuado personal en el desarrollo de esta tesis.

Al Doctor Federico Rojo, por su soporte en el desarrollo de parte de los estudios que se han utilizado como base de las publicaciones para defender esta tesis doctoral.

A los Profesores Miquel Vilardell, Josep Bosch, Joaquín Arribas, Andrés Cervantes y Eduardo Díaz-Rubio por su ayuda en infundir el espíritu académico durante mi carrera profesional, necesaria para el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Vall
d'Hebron por su soporte incondicional durante todo el período de trabajo en el mismo.

ÍNDICE

Certificado del Director de Tesis	2
Certificado de tesis por compendio de publicaciones	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Índice	7
1.- Preámbulo	10
2.- Antecedentes	14
2.1.- Introducción	15
2.2.- Receptores tirosina quinasa	20
2.3.- Activación de la señalización de RAS-RAF-MEK-MAPK	24
2.4.- Activación de la señalización de PI3K-Akt-mTOR	29
2.5.- Desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a dianas biológicas	
Señalización celular en las células malignas	36
2.6.- La introducción de los estudios farmacodinámicos- farmacocinéticos	38
3.- Artículos de tesis	47
3.1.- Artículo de tesis 1	49
<i>Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Weekly 1-Hour and 24-Hour Infusion BMS-214662, a Farnesyltransferase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors. J Clin Oncol, 2005</i>	
3.2.- Artículo de tesis 2	50
<i>Dose- and Schedule-Dependent Inhibition of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway With Everolimus: A Phase I Tumor Pharmacodynamic Study in Patients With Advanced Solid Tumors.</i>	

J Clin Oncol, 2008

4.- Resultados y discusión	51
4.1.- Inhibición de la farnesil transferasa – BMS-214662	52
4.2.- Inhibición de mTOR (<i>mammalian target of rapamycin</i>) – Everolimus (RAD001)	60
5.- Conclusiones	72
6.- Bibliografía	76
7.- Apéndice: Otras publicaciones	94

PREÁMBULO

PREÁMBULO

El incremento en el conocimiento de la biología molecular tanto de las células normales como de las células neoplásicas ha permitido conocer a fondo las propiedades que diferencian a ambos tipos celulares ^{1,2}. De todas estas capacidades la autosuficiencia en señales proliferativas que presenta la célula maligna es la más importante para el desarrollo inicial de los tumores. En estos últimos años se ha establecido una carrera para desarrollar nuevos fármacos dirigidos a dianas biológicas, para inhibir estas señales proliferativas, fundamentalmente la vía de RAS-RAF-MEK-MAPK y la vía de PI3K-Akt-mTOR.

Un modo de optimizar el desarrollo de estos nuevos tratamientos en la práctica médica es mediante la implementación de biomarcadores que nos permitan definir la dosis y el esquema terapéutico más adecuados. Los fármacos dirigidos contra estas dianas biológicas suelen ser más específicos de las características asociadas a las células malignas con respecto a las células benignas y por tanto la definición de la dosis y el esquema terapéutico más adecuados no puede venir únicamente determinado por las toxicidades que estos agentes causan en los tejidos normales del organismo, ya que estas pueden ser poco relevantes o inexistentes en algunos casos, o aparecer a dosis muy por encima de las consideradas necesarias para ejercer su actividad terapéutica en las células malignas. Sin embargo, es muy importante definir la dosis y el esquema terapéutico más adecuado para poder desarrollar estos fármacos y, de forma muy importante, poderlos combinar posteriormente con otros medicamentos demostrados activos en el tratamiento del cáncer. Por este motivo es fundamental poder definir la dosis biológica óptima (DBO), que será la que produce el efecto máximo o considerado terapéuticamente adecuado sobre las células malignas, situado en muchas ocasiones,

distante de la dosis considerada tóxica. En este sentido para definir la DOB se pueden utilizar estudios farmacodinámicos tanto en muestras que contengan células malignas así como, en algunos casos, tejidos sanos, siempre y cuando la señal biológica que el medicamento en investigación quiere inactivar esté presente en el tejido sano. Una vez obtenidas estas muestras se determinan los análisis farmacodinámicos que, habitualmente, incluyen la inhibición de la diana terapéutica contra la cual va dirigido el fármaco, la inhibición de alguna proteína efectora situada en un nivel más inferior de la cascada de señalización y por último la inhibición de la proliferación celular y/o la inducción de apoptosis. En algunas ocasiones, cuando se conocen mecanismos potenciales de resistencia adquirida a estos fármacos, fundamentalmente por activación de vías compensatorias, también se puede determinar la activación de estas vías mediante el análisis de la activación o inhibición de alguna proteína efectora. Estos análisis se realizan habitualmente mediante técnicas de inmunohistoquímica y se miden con escalas de expresión específicas. Posteriormente se comparan los rangos de puntuación de los diferentes biomarcadores en las muestras obtenidas después de la administración del fármaco con respecto a las muestras basales obtenidas antes de la administración del fármaco en estudio, y así se determina como el fármaco inhibe la diana biológica y las respuestas biológicas celulares que produce. Los resultados de estos estudios farmacodinámicos se deben correlacionar posteriormente con los estudios farmacocinéticos realizados lo cuál nos permite evaluar si existe una buena relación farmacocinética farmacodinámica. Con este proceso de modelización, y teniendo en cuenta los diferentes esquemas de tratamiento y dosis administradas, podremos definir cuál es la mejor dosis y esquema de administración de un determinado fármaco.

Esta memoria para defender este proyecto de tesis consta de tres apartados. En un primer apartado se revisa brevemente los antecedentes sobre la importancia de las señales de proliferación en las células malignas. En un segundo apartado se describen los métodos clásicos de desarrollo de fármacos nuevos en oncología y como los métodos que implementan modelos farmacodinámicos-farmacocinéticos permiten un desarrollo más optimizado de los fármacos dirigidos a dianas biológicas. Por último, el tercer apartado de la memoria, consiste en la presentación de los dos artículos de tesis que siguen las líneas de investigación del modelo de desarrollo de fármacos propuesto. En el primer trabajo se caracteriza el desarrollo de un fármaco, BMS-214662, dirigido inicialmente a bloquear la transformación de la proteína RAS por la célula, proteína considerada fundamental para la activación de la señal proliferativa RAS-RAF-MEK-MAPK³. En el segundo artículo se describe la caracterización del fármaco Everolimus o RAD001, inhibidor de la proteína mTOR, proteína central efectora en la señal mediada por PI3K-Akt-mTOR⁴. La presentación de los dos artículos se acompaña de una breve discusión de los resultados de los mismos.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Introducción

El incremento en el conocimiento de la biología molecular tanto de las células normales como de las células neoplásicas está permitiendo conocer a fondo las propiedades que diferencian ambos tipos celulares. El cáncer es el resultado de múltiples alteraciones genéticas sucesivas que confieren a las células transformadas una serie de características que las distinguen de las células no transformadas o normales. En este sentido, Hanahan y Weinberg describieron hace 10 años las diferentes alteraciones que el cáncer puede tener, diferenciándolo así de las células y tejidos normales, pudiéndolas agrupar en seis propiedades diferenciales ¹. Estas propiedades están presentes en los diferentes tipos celulares independientemente de cuál sea su origen o su localización geográfica. Estas capacidades adquiridas del cáncer incluyen la autosuficiencia en señales proliferativas con capacidad de crecimiento autónomo, la insensibilidad en señales anti-proliferativas, la evasión de la apoptosis, la adquisición de un potencial replicativo ilimitado o inmortalidad celular, la capacidad de formación de vasos sanguíneos para el aporte de nutrientes o angiogénesis, y la capacidad de invasión tisular y de desarrollar metástasis. En una reciente actualización, los mismos autores han descrito cuatro propiedades más que caracterizan a la formación de tumores ². Estas cuatro propiedades adicionales consisten en la evasión de la destrucción inmune de las células malignas, la inflamación inducida por el tumor, las mutaciones e inestabilidad genómica de la célula maligna y las alteraciones en los mecanismos de obtención de la energía celular. Debido a estas propiedades diferenciales entre las células normales y las células transformadas o neoplásicas y propiciado por el conocimiento de la biología molecular, en los últimos años ha existido

un gran interés para desarrollar estrategias terapéuticas que sean capaces de revertir estas características de las células malignas y de los fenómenos inflamatorios e inmunitarios asociados. De todas estas capacidades, la autosuficiencia en señales proliferativas es la más importante para producir el desarrollo inicial de los tumores.

La capacidad de una célula para responder a su medio ambiente es esencial para su supervivencia. Las respuestas a corto plazo a estímulos externos del microambiente ocurren de forma rápida, suelen ser transitorias y vienen mediadas en la mayoría de las circunstancias por modificaciones de proteínas ya existentes, fundamentalmente por fosforilación de las mismas, aunque en algunos casos también es debido a defosforilación de ellas. Por el contrario, las respuestas a largo plazo suelen ser el resultado de cambios en la transcripción de genes. Los factores de transcripción suelen estar de forma inactiva en el citoplasma o más comúnmente en el núcleo de la célula y se activan a consecuencia de señales externas que son capaces de activar la señal de transducción celular. En las células malignas, este proceso de activación de estas señales de transducción proliferativas está en muchas ocasiones constitutivamente alterado en una forma de hiperactivación por múltiples mecanismos. En primer lugar debe señalarse la posibilidad de que los receptores externos celulares estén en un estado de activación continua, determinado por la sobreexpresión del receptor, por una amplificación del gen que codifica al mismo o por una mutación de una parte del mismo que le configure una actividad constitutivamente activa. En algunas situaciones este proceso puede venir determinado o incrementado por una presencia desmesurada de ligandos que activen el receptor, ya sean de producción autócrina, paracrina o endocrina. Una segunda posibilidad de hiperactivación de estas señales de transducción puede venir determinada por la existencia de mutaciones en las proteínas de señalización intracelular que determine una activación constitutiva de dicha proteína

efectora. En este sentido amplificaciones de los genes que codifican estas proteínas efectoras también se pueden traducir en un incremento de la actividad de las proteínas efectoras. De forma alternativa, mutaciones en proteínas represoras de la señal de transducción o deleciones en los genes que codifican las mismas pueden producir por falta de represión una hiperactivación de las señales de transducción.

Existen como mínimo ocho clases de receptores celulares diferentes que son capaces de activar vías de señalización intracelular. El funcionamiento de la mayoría de receptores, al unirse los ligandos activadores a los mismos, se produce por la activación de dos o más moléculas de receptores para formar un complejo en la superficie celular. La tabla 1 recoge los 8 diferentes tipos de receptores existentes, así como los tipos de ligandos o factores de crecimiento que los activan, las señales de transducción que utilizan y los factores de transcripción que activan⁵.

La mayoría de vías de señalización involucran a una o varias proteínas con actividad quinasa. Esta actividad quinasa está localizada en algunos receptores en la región intracelular del receptor –que contiene el dominio catalítico- y en otros en una proteína íntimamente ligada al receptor. Esto resulta en la activación de factores específicos de transcripción que están localizados en el citosol, o en otros casos localizados en el núcleo. En esta última situación, la actividad quinasa del receptor debe activar otra(s) proteína(s) quinasa(s) del citoplasma, y al final una de ellas penetrará en el núcleo (translocación) y fosforilará factores específicos de transcripción en el núcleo. Existen otros mecanismos de activación de receptores y señalización intracitoplasmática y nuclear pero no son objeto de esta introducción ya que no forman parte del tema a desarrollar en esta tesis.

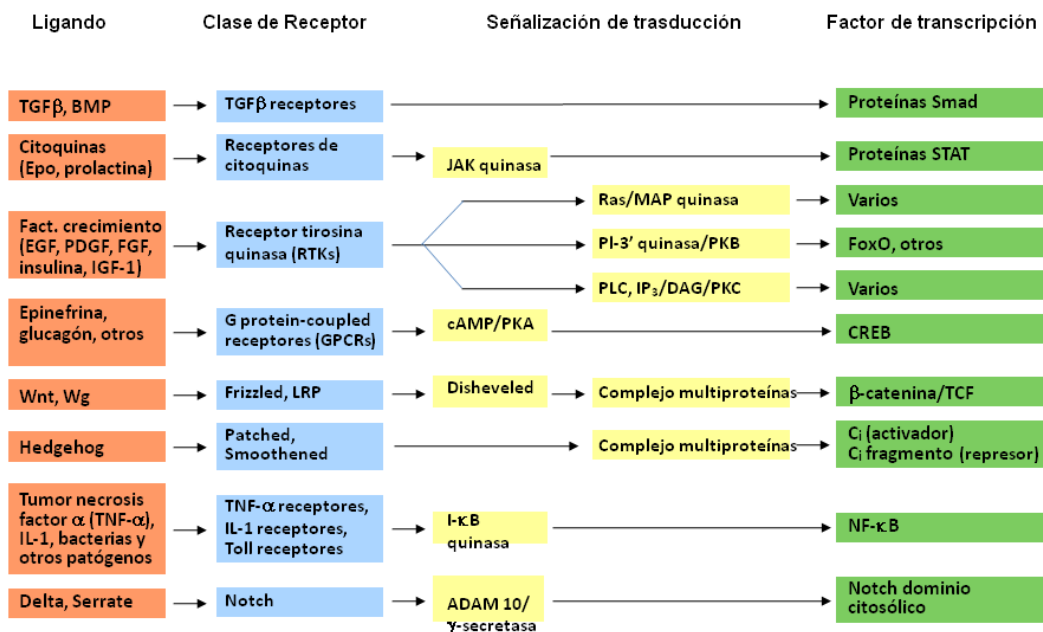


Tabla 1. Componentes y modulación de las vías de señalización originadas en receptores, activadas por ligandos o factores de crecimiento, las señales de transducción que utilizan y los factores de transcripción que activan.

Un fenómeno extremadamente importante en el funcionamiento de las células complejas como la de los mamíferos es lo que se conoce como comunicación entre diferentes señales o *cross talk*⁶. Una célula humana expresa aproximadamente 100 tipos de receptores de superficie diferentes, muchos de los cuáles activan las mismas señales de transducción celular. Algunos receptores pueden activar más de una señal de transducción y la dependencia o preferencia de una señal de transducción respecto a otra, depende, en muchas circunstancias, del tipo celular⁷. Muchos genes están regulados por múltiples factores de transcripción, los cuáles a su vez pueden estar activados por una o múltiples señales extracelulares. Esta comunicación entre diferentes receptores y diferentes señales de transducción hace que el proceso de

señalización sea extremadamente complejo con múltiples interacciones entre vías, lo cual da individualidad a los diferentes tipos celulares pero también ofrece posibilidades de escape de la señal en las células neoplásicas cuando éstas son tratadas con algún fármaco inhibitorio de alguna vía de señalización. A pesar de que la descripción de las señales de transducción objeto de esta tesis doctoral se hacen por separado en esta introducción, como se ha comentado anteriormente existe interacción notable y crítica entre ellas. En este sentido se considera la señalización en base a los ligandos o factores de crecimiento, los receptores, las señales de transducción intracelular y los factores de transcripción regulados por estas vías.

Receptores tirosina quinasa

Los receptores tirosina quinasa están en forma monomérica, dímeros o tetradímeros⁸. Los receptores monoméricos se dimerizan durante el proceso de activación por los ligandos, también conocidos como factores de crecimiento. La unión del ligando al dominio externo del receptor produce la formación de dímeros funcionales y la fosforilación del dominio interno del receptor, activando su función catalítica. La activación del receptor resulta en otras fosforilaciones de residuos tirosina en el dominio interno o citosólico del receptor así como la fosforilación de otros substratos proteicos que forman parte de la señal de transducción⁹. La superfamilia de receptores tirosina quinasa incluyen entre otros la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER), de la insulina (IR), del *insulin-like growth factor* (IGFR), del *platelet-derived growth factor* (PDGFR), y del *fibroblast growth factor* (FGFR)⁸. De entre los diferentes receptores tirosina quinasa existentes en las células humanas, la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER) es especialmente importante por las implicaciones que tiene en la normal homeostasis de las células así como en el papel oncogénico del desarrollo de los tumores humanos¹⁰. Mientras que HER-1 o EGFR, HER-3 y HER-4 son dimerizados y por tanto activados tras la unión con ligandos específicos, HER-2 no se une a ningún ligando, pero es capaz de formar dímeros con otros receptores de la misma familia (HER-1, HER-3 y HER-4) cuando estos están unidos a sus respectivos ligandos^{11,12}. En este mismo sentido HER-1, HER-3 y HER-4, tras unirse a los ligandos específicos pueden dimerizarse bien en forma de homodímeros (con otro receptor igual) o heterodímeros (con otro receptor diferente pero perteneciente a la misma familia HER)¹³. En general, en los receptores tirosina quinasa, la unión de los ligandos al dominio externo del receptor causa un cambio conformacional en el mismo que produce la activación funcional del dímero (o

tetrámero) mediante el acercamiento de dos quinasas, una de cada monómero, las cuáles fosforilan una a la otra, un residuo tirosina localizado en el labio de activación del dominio interno del receptor inicialmente inactivo (figura 1a)⁸. La fosforilación de este labio de activación hace que se sitúe en una zona más abierta permitiendo que una molécula de ATP o una proteína substrato se pueda unir (figura 1b). En los receptores de la familia EGFR/HER, la dimerización se produce por la activación de un brazo de dimerización en cada receptor, fruto de la unión del ligando con el receptor, provocando un cambio conformacional y por tanto la unión a otro receptor que esté en la misma situación^{8,13,14,15,16}. Finalmente la quinasa activada fosforila otros residuos tirosina en el dominio catalítico (figura 1c). Una vez activados estos receptores, algunos residuos tirosina fosforilados actúan como amarres para proteínas involucradas en la señal de transducción. Estas proteínas tienen dominios PTB o SH2 que son los que se unen a los residuos de tirosina fosforilados de la región intracelular del receptor activado. Este proceso hace que el receptor activado sea capaz de activar estas proteínas de la señal de transducción mediante la fosforilación de las mismas gracias a la capacidad catalítica del receptor activado (figura 2). Algunos receptores tirosina quinasa utilizan proteínas que tienen una función multi-amarre como por ejemplo IRS-1, lo cual permite que se incremente el número de proteínas que son reclutadas y activadas por el dominio catalítico del receptor⁸.

El mecanismo principal que tiene la célula para reducir el número de receptores tirosina quinasa viene determinado por la endocitosis del complejo ligando-receptor y

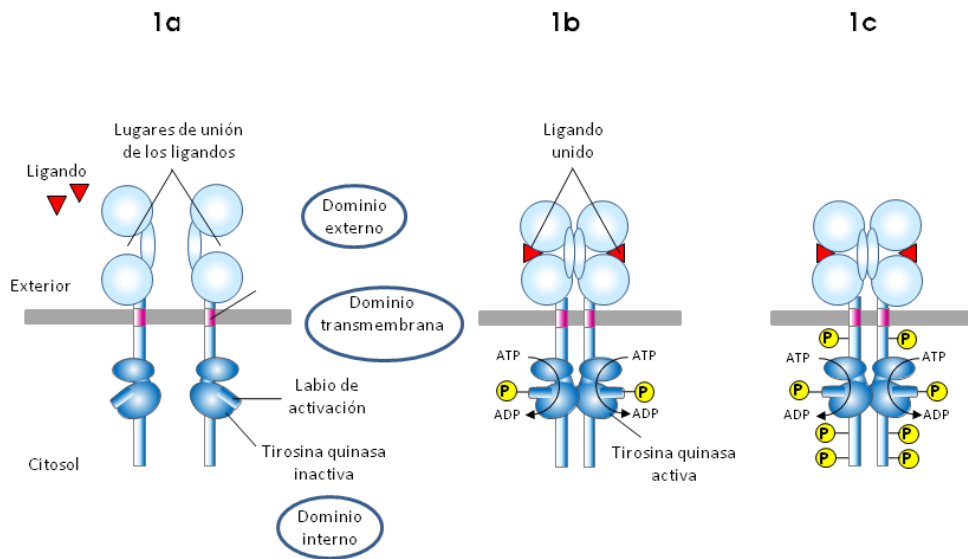


Figura 1. Estructura de los receptores tirosina quinasa y mecanismo de activación de los mismos: a) Ligando no unido al receptor – receptor inactivo en forma de monomero; b) Ligando unido al dominio externo del receptor – cambio en la conformación del receptor con dimerización del mismo y fosforilación de las tirosinas del labio de activación – receptor activado; c) Fosforilación de tirosinas adicionales que permite aumentar el número de amarres para activar proteínas de la señal de transducción.

su posterior degradación mediante el complejo de lisosomas. Este proceso hace que se conserve una homeostasis o balance entre la activación del receptor por el ligando y la posterior activación de la señal de transducción y la degradación de los receptores activados con la consiguiente disminución numérica de los mismos. Este balance está claramente alterado en las células neoplásicas, donde mecanismos tales como la sobreexpresión de receptores y amplificación de los genes codificantes de dichos receptores hacen que haya un gran número de receptores dispuestos a ser activados.

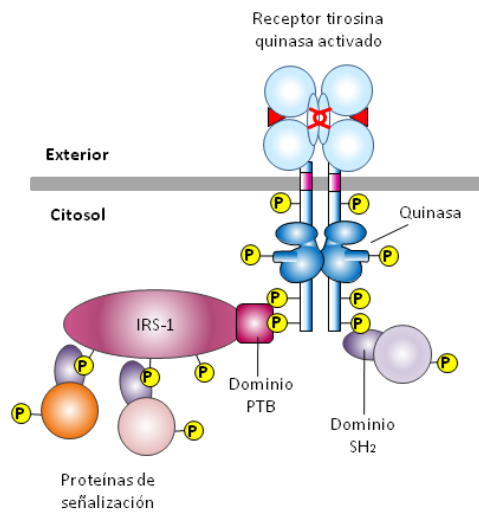


Figura 2. El reclutamiento de las proteínas de señalización intracelular se realiza mediante la unión de las mismas a los residuos fosforilados del dominio interno del receptor activado o mediante la unión a proteínas asociadas a los receptores con múltiples lugares de amarre, amplificando por tanto la señalización. Estas proteínas de señalización del citosol tienen dominios SH2 o PTB y se unen a los residuos fosforilados del dominio interno del receptor activado o a proteínas asociadas a los receptores, como IRS-1, todo ello amplificando la señalización.

Activación de la señalización de RAS-RAF-MEK-MAPK

Todos los receptores tirosina quinasa pueden activar la señalización mediada por RAS-RAF-MEK-MAPK, y algunos receptores de citoquinas, mediante la activación de JAK, también pueden secundariamente activar la vía de RAS-RAF-MEK-MAPK.

La proteína RAS es una proteína G monomérica pequeña que pertenece a la superfamilia de GTPasas o proteínas interruptor intracelular. RAS alterna entre un estado activo, en el que se encuentra unido a una molécula de GTP, y un estado inactivo en el que se encuentra unido a una molécula de GDP. La actividad de la proteína RAS está regulada por múltiple factores. La activación de RAS está acelerada por un *guanine nucleotide-exchange factor* (GEF) el cuál se une al complejo RAS-GDP, causando la disociación del complejo en RAS y GDP. Dado que las concentraciones de GTP exceden de forma notable a las de GDP en la célula, GTP se une de forma espontánea a RAS liberando al complejo GEF y formando la molécula activa RAS-GTP.

La hidrólisis posterior de GTP a GDP desactiva la molécula de RAS. Este proceso que intrínsecamente está mediado por la capacidad hidrolítica constitutiva de RAS, está acelerado por la actuación de otra proteína, la *GTPase-activating protein* (GAP). Este proceso de activación de RAS a partir del receptor tirosina quinasa fosforilado no se efectúa directamente sino a través de la ayuda de dos proteínas citosólicas, GRB2 y Sos. GRB2 tiene un dominio SH2 que se une al residuo fosforilado del dominio endocelular del receptor activado, GRB2 tiene además dos dominios SH¹ que unen y activan Sos. Finalmente Sos es la proteína GEF que cataliza la conversión de RAS-GDP a RAS-GTP (figura 3) ⁹. El ciclo de RAS requiere, por tanto, la asistencia de dos proteínas GEF y GAP. RAS es una de las proteínas que se haya más

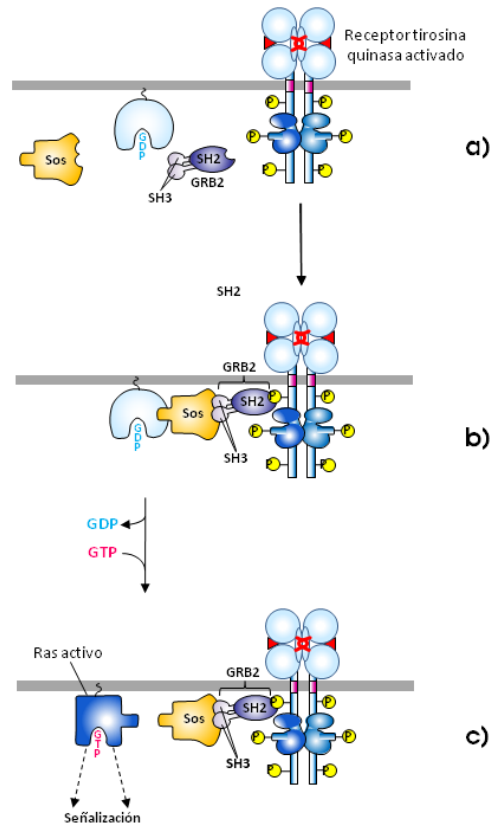


Figura 3. Activación de RAS tras la activación del receptor tirosina quinasa: a) La proteína citosólica adaptadora GRB2 se une a un residuo fosforilado del receptor activado y a la proteína citosólica Sos, y todo ello atrae a la proteína RAS inactiva (RAS-GDP) uniéndose a este complejo; b) la actividad GEF de Sos promueve la disociación de la molécula GDP de RAS y la unión de una molécula GTP a RAS, constituyéndose el RAS-GTP o RAS activo; c) RAS-GTP o RAS activo se disocia de Sos y continúa la señalización.

frecuentemente mutada en los tumores humanos¹⁷. La mayoría de mutaciones oncogénicas de RAS se producen en el codón 12, con la sustitución de la Glicina en esta posición por cualquier otro aminoácido. A nivel funcional esto se traduce en un bloqueo de la unión de la proteína GAP al complejo RAS-GTP, lo que hace que RAS esté constitutivamente activado en la situación RAS-GTP¹⁸.

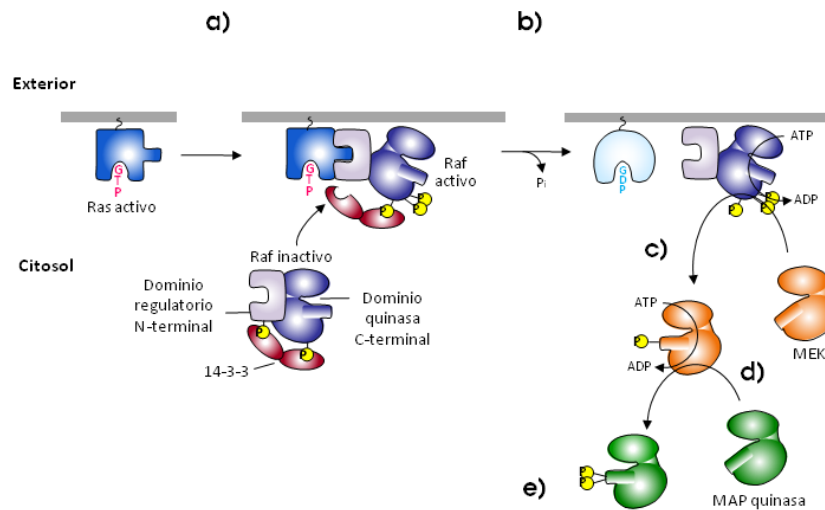


Figura 4. Activación de la señalización RAS-RAF-MEK-MAPK: a) RAS-GTP o RAS activo recluta a RAF inactivo, se une a él y lo activa. RAF inactivo está estabilizado por su unión a la proteína 14-3-3, la interacción del dominio regulador N-terminal de RAF inactivo con RAS-GTP libera la inhibición de 14-3-3 lo que conduce a la activación de la actividad quinasa de RAF; b) la hidrólisis del GTP de RAS activo mediante la actividad GTPasa, produce la transformación de RAS-GTP en RAS-GDP y la disociación de RAS y RAF; c) RAF se une a MEK (MAP and ERK kinase), otra proteína serina-treonina quinasa, mediante su residuo catalítico C-terminal, fosforilando y activando a MEK; d) MEK fosforila MAPK, otra proteína serina-treonina quinasa también llamada ERK, activándola; e) la proteína MAPK activa se dimeriza y transloca al núcleo, activando múltiples factores de transcripción.

El complejo activo RAS-GTP se une al fragmento N-terminal de RAF, una proteína serina-treonina quinasa (figura 4a). La hidrólisis de RAS-GTP a RAS-GDP hace que RAF sea fosforilado –y por tanto activado- y posteriormente sea liberado (figura 4b) ^{19,20}. RAF se une a MEK (*MAP and ERK kinase*), otra proteína serina-treonina quinasa,

mediante su residuo catalítico C-terminal, fosforilando y activando a MEK (figura 4c). Finalmente, MEK fosforila MAPK, otra proteína serina-treonina quinasa también llamada ERK (figura 4d) ²¹. MAPK fosforila diferentes proteínas, incluyendo factores nucleares de transcripción, lo cual produce como paso final respuestas celulares. La fosforilación de MAPK mediada por MEK se da fundamentalmente en dos pasos, primero se produce una fosforilación crítica del residuo tirosina 185 y posteriormente se produce una fosforilación del residuo treonina 183. Esta fosforilación del residuo tirosina 185 es la responsable de que MAPK adquiera su capacidad catalítica, que diferentes proteínas se unan a MAPK y por último, que MAPK se dimerize (figura 4e). Únicamente la forma dimerizada de MAPK se puede translocar al núcleo, donde regulará la actividad de numerosos factores de transcripción nuclear ²².

La inducción de la transcripción nuclear por MAPK (figura 5) se inicia por la fosforilación y activación de la proteína quinasa p90^{RSK} la cual se mueve al núcleo y fosforila factor de transcripción SRF (*serum transcription factor*). El dímero activado MAPK se transloca al núcleo y directamente fosforila otro factor de transcripción, el TCF (*ternary complex factor*). Los factores de transcripción fosforilados TCF y SRF actúan conjuntamente para estimular la transcripción de genes de respuesta precoz tales como c-Fos o c-Jun que contienen un SRE (*serum response element*) en su promotor.

En el proceso de transducción de señales, diferentes factores de crecimiento inducen diferentes señalizaciones mediadas por MAPK, las cuáles a su vez regulan diferentes

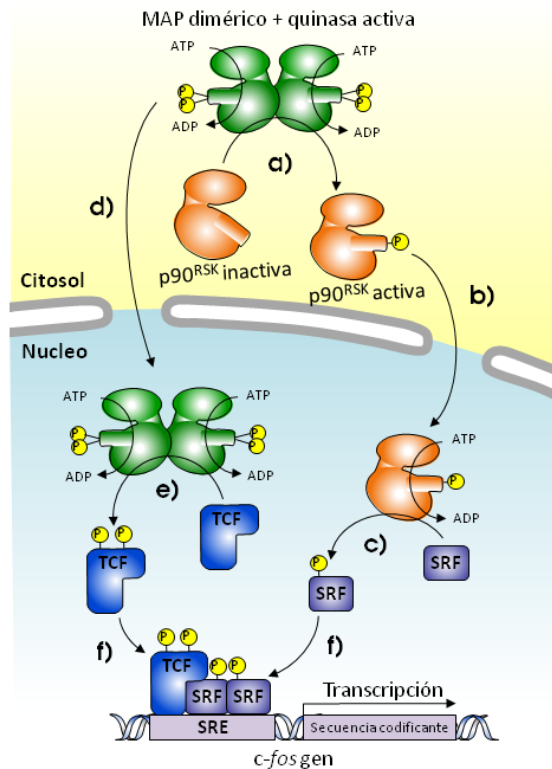


Figura 5. Inducción del proceso de transcripción por MAPK: a) MAPK activa y dimerizada fosforila la proteína quinasa p90^{RSK} activando a la misma; b) p90^{RSK} activada penetra en el núcleo y; c) es capaz de fosforilar al factor de transcripción SRF; d) MAPK activa y dimerizada entra el núcleo y; e) fosforila al factor de transcripción TCF; f) finalmente los factores de transcripción fosforilados SRF y TCF actúan conjuntamente estimulando la transcripción de genes que contienen una secuencia SRE en su fragmento promotor.

procesos celulares. La presencia de diferentes proteínas armazón (*scaffold proteins*) hace que las células eucariotas pueden tener diferentes señalizaciones mediadas por la vía de MAPK ²³. Los componentes de esta señalización por encima de MAPK se arman en complejos de señalización estabilizados por diferentes proteínas armazón. Este proceso asegura que la activación de una vía por una particular señal extracelular no active otras vías que contienen elementos compartidos ²⁴.

Activación de la señalización de PI3K-Akt-mTOR

Hoy en día está bien establecido que la vía de señalización de PI3K (fosfoinositol 3-quinasa o fosfoinositida-3-quinasa) tiene un papel central en varios procesos celulares que contribuyen al mantenimiento tanto de la célula benigna como de la maligna ^{25,26}. La señalización inapropiada de PI3K es una de las alteraciones más frecuentes en los tumores humanos y se considera crítica para la progresión tumoral ²⁷. Se han descrito una gran variedad de mutaciones, amplificaciones y pérdidas de función de componentes de esta señal de transducción celular, con grandes implicaciones no sólo en el proceso de tumorigénesis, sino también en el desarrollo de resistencia a tratamientos hormonales y citotóxicos y a terapias dirigidas a dianas biológicas. El incremento en el conocimiento de la biología molecular nos ha permitido avanzar en el entendimiento de esta señal de transducción de señal, su compleja señalización tras la activación de PI3K, así como las interacciones y *cross talk* con otras señales de transducción como la de RAS-RAF-MEK-MAPK. Este conocimiento se ha traducido además en el descubrimiento de fármacos dirigidos a elementos clave de esta señal de transducción ^{28,29,30}. La PI3K es en realidad una familia de quinasas lipídicas que tienen como función bioquímica primaria la fosforilación del grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo inositol de una serie de moléculas llamadas fosfatidilinositoles. Esta fosforilación resulta en la activación de segundos mensajeros, el más importante de ellos la proteína serina-treonina quinasa B (PKB o Akt), con la consiguiente activación de una serie de funciones celulares metabólicas y de supervivencia celular ³¹. La familia de enzimas PI3K están agrupadas en tres clases (I-III), con diferencias en la estructura y en la preferencia en los sustratos sobre los que actúan ^{26,32}. La clase I de PI3K regula diferentes procesos como la homeostasis de la glucosa y otras vías metabólicas, el crecimiento, la proliferación, la motilidad y la supervivencia celular; y

agrupa las moléculas de PI3K que están implicadas en cáncer. En la introducción de esta tesis sólo se va a desarrollar este tipo de moléculas de la familia de PI3K. La subclase IA son heterodimeros formados por una subunidad regulatoria (p85) y una subunidad catalítica (p110), y están comúnmente implicados en procesos malignos humanos. Tres genes, *PIK3R1*, *PIK3R2*, y *PIK3R3*, codifican las subunidades regulatorias p85alfa, p85beta, y p55gamma, respectivamente. Las isoformas de la subunidad catalítica p110alfa, p110beta y p110delta son los productos de tres genes *PIK3CA*, *PIK3CB*, y *PIK3CD*, respectivamente. Mutaciones en los genes *PIK3CA* y *PIK3R1* producen activación de la señal de PI3K y se encuentran frecuentemente en tumores humanos. Existen tres isoformas de PI3K pertenecientes a la clase IA, llamadas PI3Kalfa, PI3Kbeta, y PI3Kdelta, formadas por las respectivas subunidades catalíticas p110 unidas a la subunidad regulatoria p85. Las moléculas de PI3K pertenecientes a la clase IB, llamadas PI3Kgamma están formadas por heterodímeros de una subunidad catalítica p110 (p110gamma) con diferentes subunidades regulatorias (p101 o p84). Las moléculas PI3Kalfa y PI3Kbeta están ubicuamente expresadas e influyen la proliferación celular y la señalización de la insulina, mientras que las moléculas PI3Kgamma y PI3Kdelta están mayoritariamente involucradas en los procesos inflamatorios e inmunes y por tanto mayoritariamente expresados en leucocitos, pero también se supone que puede tener un rol en la génesis de tumores sólidos.

La activación de las moléculas de la clase IA de PI3K se inicia cuando un factor de crecimiento o ligando se une al dominio externo de un receptor tirosina quinasa, tales como la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER), los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y los receptores de la insulina (IR) y los receptores del factor de crecimiento insulina-like tipo I (IGFR-

1). La activación de estos receptores con el consiguiente proceso de autofosforilación permite al heterodimero de PI3K interactuar con su porción intracelular vía el residuo p85. Este es particularmente el caso del receptor HER3, el cual tiene muchos amarres para la subunidad p85, lo cual es opuesto a lo que sucede en el receptor HER2, que es incapaz de atraer y unir a PI3K. En este sentido, los heterodímeros de HER2-HER3, permite que células malignas que sobreexpresen HER-2, como algunos tipos de cáncer de mama y gástrico, puedan producir señales tumorigénicas a través de PI3K ⁷. La activación de los receptores tirosina quinasa de membrana hace que la subunidad regulatoria p85 de PI3K se una a los residuos fosforilados del receptor y deje por tanto de inhibir a la subunidad catalítica p110, y localiza a PI3K en la membrana citoplasmática. En esta situación PI3K es capaz de añadir un grupo fosfato a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en la posición 3'OH y por tanto transformarse en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) (figura 6a). Hoy en día también se ha identificado otra vía de activación de la mayoría de moléculas de PI3K de clase I, mediante Receptores con proteína G acoplada (GPCRs), bien directamente en el caso de p110 beta y p110 gamma, o indirectamente, a través del dominio de unión a RAS. En la cascada de señalización de PI3K, el proceso inicial de activación no es la fosforilación de una proteína intracitoplasmática como ocurría en la vía de RAS-RAF-MEK-MAPK, sino la incorporación de un grupo fosfato a PIP2. También es bien sabido que la molécula RAS-GTP o RAS activo es capaz de unirse a PI3K a través del residuo p110 y producir su activación funcional. Así mismo la unión de PI3K a RAS-GTP hace que PI3K se localice también en la parte interna de la membrana celular y por tanto esté en la zona donde está su grupo moléculas sustrato, los fosfatidilinositoles, y producir la activación de la señalización. Una vez PI3K se activa por cualquiera de estas asociaciones, PI3K tiene un papel central muy importante en diferentes procesos

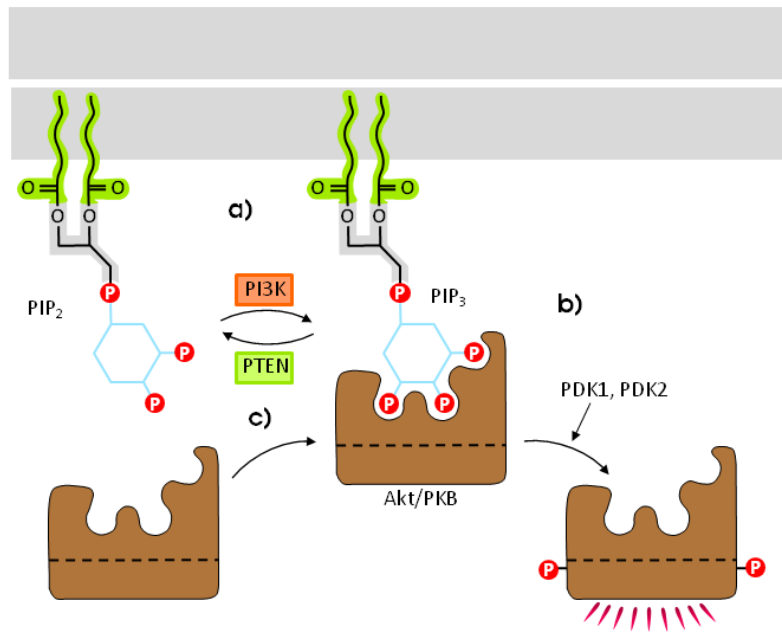


Figura 6. Activación de PIP3 y Akt/PKB: a) Activación de fosfatidil-inositol (4,5) difosfato (PIP2) a fosfatidil-inositol (3,4,5) trifosfato (PIP3) mediante la transferencia de un grupo fosfato por PI3K; b) La activación de PIP3 crea un punto de anclaje para proteínas citoplasmáticas que tienen homólogos PH (*pleckstrin homology*), siendo el más importante Akt/PKB, el cual se une a la parte interna de la membrana citoplasmática y es doblemente fosforilado por dos quinasas, PDK1 y mTORC2 (PDK2), y por lo tanto activado. Akt/PKB activado produce la fosforilación de una serie de sustratos que regulan la proliferación, la supervivencia y el crecimiento celular; c) Si PTEN está presente y activo, es capaz de desfosforilar PIP3 y convertirlo en PIP2, impidiendo que Akt/PKB se localice en el punto de unión y se active.

de señalización. Por este motivo PI3K es activado no sólo por los receptores mencionados anteriormente, sino también por otros inducidos por otras citoquinas tales como interleuquina-3 y la activación de las integrinas mediadas por la matriz extracelular.

Para continuar la propagación de la señal intracelular, PIP3 se une a los dominios PH (*pleckstrin homology*) de varias proteínas de señalización. De esta manera PIP3 atrae a dos proteínas serina/treonina quinasas, la quinasa fosfoinositidil dependiente 1 (PDK1) y Akt o proteína quinasa B (PKB)³¹. Se han identificado tres isoformas de Akt, Akt1, Akt2 y Akt3, también llamadas PKBalfa, PKBbeta y PKBgama, respectivamente. A pesar que son producto de tres genes diferentes las tres isoformas de Akt tienen una homología superior al 80% a nivel del dominio quinasa catalítico. La actividad de señalización de PDK1 se produce mediante la fosforilación y activación de proteínas quinasa inferiores tales como las isoformas de Akt en el residuo treonina-308. Una segunda fosforilación de Akt se produce en el residuo serina-473, situado en el dominio helical de Akt, en este caso mediada por el complejo mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-rictor (mTORC2). Las dos fosforilaciones de Akt son necesarias para la activación completa de la misma. Cuando Akt está completamente fosforilado, este se desprende de su localización en la membrana y se dirige al citosol o al núcleo celular para fosforilar otras moléculas sustrato involucradas en la progresión del ciclo celular, en el crecimiento y proliferación de la célula, su supervivencia, en la síntesis proteica y metabolismo y en la señalización anti-apoptótica.

La progresión del ciclo celular mediada por PI3K/Akt se produce por varios mecanismos, la mayoría ligados a la doble activación de PI3K y Akt, pero otros sólo ligados a activación de algunas isoformas de PI3K. Akt ejerce su efecto sobre la proliferación mediante la inactivación de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (Cdk) tales como p27^{KIP1} y p21, a través de su acción sobre *forkhead box O* (FOXO), una subfamilia de los factores de transcripción *forkhead*. FOXO es retenido en el citosol y por lo tanto no es capaz de estimular la transcripción de genes pro-apoptóticos tales como el ligando *Fas*, *Bim* y *BAD*. Además Akt fosforila BAD y lo libera

del complejo formado con Bcl-2 o Bcl-X_L, lo cual también activa la función anti-apoptótica. La fosforilación de MDM2 producida por Akt antagoniza la apoptosis mediada por p53. Akt, a través de la activación del inhibidor de la quinasa kappaB (IKK), impide la regulación negativa del factor de transcripción factor nuclear kappaB (NFkappaB), permitiendo ello la traslocación de NFkappaB al núcleo y la consiguiente estimulación de la transcripción de genes de supervivencia. Akt promueve la progresión del ciclo celular a través de la inhibición de la quinasa de síntesis de glicógeno 3 (GSK3), produciendo la estabilización de ciclina D1 y de c-Myc. Akt también controla el crecimiento celular mediante la fosforilación del complejo serina/treonina mTOR-raptor (mTORC1). Akt puede fosforilar y activar mTORC1 tanto directamente en los residuos treonina-2446 y serina-2448 o indirectamente mediante la fosforilación e inactivación del complejo de la tuberosis esclerosa 2 (TSC2) también llamado tuberina, que normalmente inhibe mTOR a través de la proteína de unión GTP Rheb (*Ras homolog enriched in Brain*). De esta manera mTORC1 fosforila las proteínas quinasas ribosomales S6 (S6K1 y S6K2) y la proteína de unión 1 del factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) (4EBP1), componentes involucrados en la biogénesis ribosomal y la traslación del ARN mensajero, determinantes del crecimiento y tamaño celular. La fosforilación de 4E-BP1 y de S6K1 y S6K2 se ve reducida por la sobreexpresión de un componente de mTORC1 llamado PRAS40 (sustrato de Akt rico en prolina 40kDa). PRAS40 se une a raptor y funciona como un sustrato de mTORC1 que inhibe la señalización compitiendo con la unión y fosforilación a 4EBPs y S6Ks. De forma adicional, mTORC1 sobrerregula la expresión del factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF-1alpha), el cual promueve el proceso de angiogénesis mediante la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

El mecanismo más importante para frenar la actividad de la vía de PI3K viene regulado por PTEN (*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), inicialmente identificado como un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 10 (10q23)³³. La función de PTEN es la de eliminar residuos fosfato de proteínas y de lípidos, ejerciendo en este caso su función sobre PIP3 transformándolo en PIP2, antagonizando por tanto el efecto de PI3K, regulando negativamente las actividades de Akt. PTEN también actúa en el núcleo independientemente de su actividad fosfatasa impactando en el ciclo celular, la apoptosis y la integridad cromosómica. Existen disregulaciones germinales de PTEN pero de forma más frecuente se producen en la línea somática en múltiples tumores humanos.

Existen otros mecanismos de control de la vía de PI3K. La proteína S6K1, uno de los efectores de del complejo mTORC1, actúa negativamente disminuyendo la expresión de IRS1 (substrato 1 del receptor de insulina), que es una molécula adaptadora ente el IGF-1R y PI3K. Este es un efecto directo que impide la estimulación de PI3K tras la activación del eje insulina/IGF-1R. La sobreexpresión de la proteína de unión de mTOR (DEPTOR) también ha demostrado ser un mecanismo modulador de la actividad de PI3K. En condiciones normales DEPTOR inhibe los complejos mTORC1 y mTORC2. La sobreexpresión de esta proteína inhibe más a mTORC1, lo cual conduce a la activación de PI3K/mTORC2/Akt.

Con la excepción de las mutaciones de *TP53*, el gen codificante de la proteína p53, la vía de PI3K es la señalización más frecuente disregulada en los tumores humanos. La alteración más frecuentemente encontrada es la pérdida de función de PTEN, mayoritariamente por delección de su gen, seguida de la amplificación o mutación de *PIK3CA*, la amplificación o mutación de *AKT* y otros eventos menos frecuentes.

Desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a dianas biológicas

Señalización celular en las células malignas

Una de las características más importantes de las células malignas es la habilidad que tienen para generar sus propias señales mitogénicas de forma endógena. Estas señales permiten que las células malignas sean independientes de señales mitogénicas externas.

La señal mitogénica más importante en la patogénesis del cáncer es la mediada por los siguientes pasos:

Factores de crecimiento o ligandos → Receptores tirosina quinasa → Grb2 → Sos →
RAS → RAF → MEK → MAPK

En este sentido y con el objetivo de ser independientes de estímulos exógenos, las células malignas pueden adquirir la capacidad de producir y liberar factores de crecimiento que inician estas señales de forma autocrina, o alternativamente, pueden producir alteraciones en los receptores tirosina quinasa de estos factores de crecimiento, tales como mutaciones en el territorio catalítico o deleciones del dominio externo que activan constitutivamente el receptor, o sobreexpresión de los mismos con el objetivo también de aumentar la señalización y la independencia. En algunos tumores, algunas de estas proteínas intracelulares tales como RAS o RAF, están mutadas en los dominios catalíticos y por tanto constitutivamente activadas.

La otra señalización proliferativa que sigue en importancia es la mediada por PI3K. PI3K puede ser activada por algunos receptores, por RAS, o por ambos a la vez. El producto de la activación de PI3K es PIP3. En algunos tumores se observan

mutaciones constitutivas de PI3K y con menor frecuencia de Akt; sin embargo, la desregulación más frecuente de esta vía de señalización es la pérdida de función de la fosfatasa PTEN, la cual es responsable de convertir la forma activa PIP3 en la forma inactiva PIP2. La activación de PIP3 se traduce en la activación de Akt y desde éste, la multiplicación de la señal al formarse los complejos mTORC1 y mTORC2.

Ambas señales tienen una importancia fundamental en la génesis y desarrollo de la mayoría de los tumores malignos.

La introducción de los estudios farmacodinámicos-farmacocinéticos

El incremento del conocimiento de la biología molecular del cáncer ha permitido establecer algunos de los mecanismos más importantes en la génesis y crecimiento de los tumores malignos. En este sentido, en los últimos años ha habido un gran esfuerzo en el mundo académico así como en la industria farmacéutica para desarrollar nuevos fármacos dirigidos a dianas biológicas, con el objetivo de poder inhibir estas señales proliferativas. A pesar de este gran conocimiento en la biología molecular, y el desarrollo de una gran multitud de nuevos fármacos gracias a la optimización del proceso de *screening* de los mismos, un número limitado de ellos han acabado el desarrollo clínico y han sido aprobados por las autoridades regulatorias (la EMA y la FDA) y son utilizados, por tanto, en la práctica clínica diaria^{34 35}. Muchos son los factores que pueden contribuir a disminuir la tasa de atrición o a incrementar el porcentaje de éxito en el desarrollo de nuevos fármacos. En primer lugar, hoy en día se dispone de una amplia y robusta información acerca de las dianas terapéuticas, de la relevancia de dichas dianas y de la dependencia de cada tipo tumoral a ellas. En segundo lugar, disponemos de una serie de modelos que nos permiten minimizar el riesgo de toxicidad inaparente en el desarrollo preclínico, tales como el desarrollo de *gene knockouts*, ARN de interferencia (RNAi) y modelos toxicológicos preclínicos. En tercer lugar, se dispone de modelos animales más apropiados que permiten reproducir tumores en una situación más parecida a la realidad de los tumores humanos. En este sentido los modelos genéticos, ya sean transgénicos o *knockouts*, permiten tener una valoración más precisa y parecida a la realidad humana que los clásicos xenoinjertos con líneas celulares que aunque de origen humano, altamente artefactuadas por los múltiples pases que han sufrido en el laboratorio. Otro modelo que se está estableciendo en los últimos años son los llamados xenopacientes, y consisten en

explantas de tumores procedentes de pacientes, que son reproducidos en ratones y que permiten estudiar la actividad anti-tumoral de los nuevos fármacos en un modelo mucho más parecido a la realidad. Cuarto, la consecución de estudios clínicos en fase III con diseños más apropiados, con una mejor selección de pacientes y con hipótesis y diseño estadístico más adecuado permiten garantizar un mayor porcentaje de éxito en el desarrollo final de los fármacos antes de ser aprobados. En este mismo sentido, es también importante tomar decisiones de discontinuación de un fármaco lo más precozmente posible cuando tenemos algún fundamento para pensar que es altamente improbable que consiga la aprobación regulatoria. Por último, el desarrollo de biomarcadores constituye un apartado fundamental en este nuevo concepto de desarrollo de nuevos fármacos, y ello interacciona con algunos de los argumentos mencionados anteriormente, ya que estos marcadores se desarrollarán en la mayoría de las circunstancias durante el período preclínico y ayudarán a hacer más factibles los estudios en fase II y en fase III. Un grupo de biomarcadores permitirán delimitar la población de tumores (y por tanto de pacientes) que responderán al tratamiento en cuestión y un segundo grupo de biomarcadores nos ayudarán a definir la dosis y el esquema de tratamiento más adecuados. Los primeros tipos de biomarcadores, llamados predictivos, nos proporcionan información de particularidades de la célula maligna que caracterizan la respuesta a un determinado tratamiento y por tanto nos permiten diferenciar que tumores tienen más posibilidades de responder a este tratamiento. El segundo tipo de biomarcadores, llamados farmacodinámicos, nos proporcionan información del efecto de un determinado fármaco sobre la célula maligna, tanto sea por la inhibición en concreto de la diana biológica sobre la cual actúa el fármaco como por el efecto biológico final que este produce sobre la célula maligna, ya sea por la inhibición de la proliferación como por la inducción de apoptosis

Está bien reconocido que la definición de la dosis y el esquema terapéutico de administración de un fármaco es de importancia fundamental para demostrar su eficacia clínica. En este sentido, los fármacos citotóxicos antineoplásicos, caracterizados por tener un margen terapéutico relativamente estrecho, se han desarrollado en un modelo clásico de dosis ascendentes hasta llegar a la dosis que se considera tóxica y definiendo la dosis terapéutica como la que se considera la dosis máxima tolerada (DMT). Los fármacos dirigidos contra estas nuevas dianas biológicas son mucho más específicos de las propiedades características que definen el fenotipo maligno con respecto a las células benignas, y por tanto no se pueden desarrollar guiándonos únicamente por el nivel de toxicidades que reportan en el ser humano, porque estas pueden ser inexistentes o poco relevantes. Sin embargo, es fundamental definir la dosis y el esquema adecuado para poder desarrollar estos fármacos y posteriormente poderlos combinar con otros medicamentos demostrados activos en el tratamiento de las neoplasias. En este sentido, con estos nuevos fármacos se establece un nuevo concepto, el de la dosis óptima biológica (DOB), que será la que produzca el efecto máximo sobre las células malignas con mucha frecuencia alejada de la DMT ³⁸. Para definir la DOB se utilizan tanto muestras que contienen células malignas o material de las células malignas (fragmentos de biopsias tumorales, células tumorales circulantes periféricas, ADN circulante, etc.) así como en algunos casos, tejidos sanos, siempre y cuando la señal biológica que el fármaco en investigación quiere inactivar esté presente en este tejido ³⁹. En este sentido, tejidos como la piel o las células mononucleares periféricas en sangre, con alta capacidad proliferativa, pueden ser utilizadas en algunas circunstancias como sustituto de los tejidos tumorales para poder hacer estos estudios. Estos tejidos se denominan tejidos sustitutos (del inglés *surrogate tissues*) y permiten facilitar la definición de la OBD siempre y cuando

previamente se haya podido definir la equivalencia de los dos tipos de tejidos en la inhibición de la señal biológica.

Este concepto de desarrollo de fármacos con una modelización farmacocinética-farmacodinámica desde los modelos preclínicos hasta el desarrollo clínico inicial ha sido defendido por varios grupos incluido el nuestro ⁴⁰. Paul Workman acuñó este concepto con el nombre de *Pharmacological Audit Trail* (PhAT) ⁴¹. Este modelo de desarrollo de nuevos fármacos se basa en una integración de datos farmacocinéticos, farmacodinámicos y de búsqueda y de validación de biomarcadores desde las primeras etapas del desarrollo preclínico hasta el desarrollo clínico ⁴².

Tal como hemos comentado en el capítulo anterior las señales proliferativas de las células malignas vienen mediadas por lo que se denomina señales de transducción celular. Estas señales de transducción celular transmiten la señal desde la activación de un receptor en la membrana citoplasmática hasta el núcleo celular, induciendo al final respuestas de transcripción y translación celular ^{10,18}. Entre todas las señales de transcripción conocidas las dos más importantes por la relevancia que tienen en las células malignas son:

- La señal mediada por Factores de crecimiento o ligandos → Receptores tirosina quinasa → Grb2 → Sos → RAS → RAF → MEK → MAPK ^{24,43}
- La señal mediada por Factores de crecimiento o ligandos → Receptores tirosina quinasa (en ocasiones RAS activado) → PI3K → PIP3 (PTEN) → Akt → mTOR ^{26,44,45}

Ha sido demostrado que la inhibición de estas señales es fundamental para la disminución de la proliferación celular y secundariamente el aumento de apoptosis

celular. Actualmente se está considerando, en la innovación de la estrategia terapéutica, el poder inhibir las dos señales concomitantemente, con el objetivo de revertir parte de las resistencias primarias o secundarias que las células malignas pueden hacer delante de la inhibición de una sola señal, tales como la transmisión horizontal (del inglés *cross-talk*)⁴⁶ o la redundancia. Todo esto construye además sobre el concepto de letalidad sintética (del inglés *synthetic lethality*) bien establecido por múltiples autores⁴⁷⁻⁴⁹. En este sentido, es todavía más importante definir la DOB de un fármaco en concreto para poder posteriormente establecer combinaciones de los mismos y poder tener la optimización máxima entre la eficacia sobre las células malignas y la toxicidad sobre las células normales.

Nuestro grupo ha tenido desde hace 10 años un papel muy importante a nivel mundial en el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos dirigidos contra dianas biológicas incorporando estudios farmacodinámicos para definir la DOB. La utilización de estos estudios farmacodinámicos conjuntamente con un perfil farmacocinético del fármaco permite establecer la modelización farmacocinética-farmacodinámica la cual nos da la información más completa sobre el esquema y la dosis óptima a desarrollar. En este sentido nuestro grupo ha sido pionero en la optimización de las dosis y los esquemas terapéuticos utilizando este modelo. Esta tesis pretende recoger la información generada y que se está generando en los últimos años (ver bibliografía generada por nuestro grupo), focalizándose en la metodología, y posteriormente poniendo como ejemplo dos fármacos desarrollados con este modelo^{3,4}.

Hipótesis:

La identificación de la dosis biológica óptima (DBO) de un agente antineoplásico dirigido contra una diana terapéutica permite un desarrollo óptimo del mismo⁵⁰. Los

biomarcadores farmacodinámicos permiten identificar las dosis y esquemas de los agentes terapéuticos que pueden tener una mejor eficacia terapéutica con los menores efectos secundarios. Para la óptima inhibición de las señales biológicas proliferativas se debe conseguir inhibir, a ser posible dos señales proliferativas mayores. Esto es lo que sucede en la mayoría de tumores sólidos, si bien existe un grupo de tumores en los cuáles la célula maligna se ha hecho adicta a una desregulación muy específica (por ejemplo mutaciones de *EGFR* en cáncer de pulmón, mutaciones de *BRAF* en melanoma) en los cuáles se puede conseguir un control del tumor con la inhibición de una sola señal proliferativa. En las circunstancias en las que es necesario el tratamiento de combinación (mayoría de las ocasiones) la definición de la DBO de cada fármaco permitirá que se puedan asociar con más facilidad varios fármacos que inhiban estas señales proliferativas a diferentes niveles, haciendo con estas combinaciones mayores las probabilidades de éxito de los tratamientos con una mayor relevancia y eficacia terapéutica.

Objetivos:

- Objetivo principal:

- Identificar, mediante biomarcadores farmacodinámicos (en muestras tumorales o en tejidos sustitutivos), la dosis y el esquema de tratamiento más apropiado de fármacos dirigidos a dianas biológicas de señales proliferativas de las células malignas.
- Correlacionar los hallazgos farmacodinámicos con los diferentes parámetros farmacocinéticos, tales como C_{max} (concentración máxima), T_{max} (tiempo a la concentración máxima), C_{min} (concentración mínima), AUC (área bajo la curva) y CL (aclaramiento), entre otros.

- Desarrollar modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos para definir la dosis biológica óptima (DBO).
- Objetivos secundarios:
- Identificar biomarcadores predictivos de respuesta a un determinado tratamiento (principalmente en muestras tumorales)
 - Identificar marcadores de resistencia secundaria a los tratamientos (principalmente en muestras tumorales)

Metodología:

Los pacientes que participan en estudios clínicos en fase Ia o Ib, y en algunas ocasiones en estudios fase II, son informados inicialmente de todas las propiedades y de la información conocida de estos medicamentos biológicos en fase de experimentación. Esta información viene determinada principalmente por los estudios de actividad preclínica que se han hecho en modelos de laboratorio (estudios básicos, estudios preclínicos *in vitro* y estudios preclínicos *in vivo*), así como los estudios de toxicidad (estudios toxicológicos). En el proceso de información del enfermo también se informa de la necesidad de extraer muestras de sangre, para controlar las toxicidades hematológicas, así como para hacer determinaciones farmacocinéticas. También se explica la necesidad de obtener muestras tumorales (ya sean de biopsias tumorales o de muestras de células circulantes) obtenidas antes de la primera dosificación y habitualmente en el momento en que la concentración es mínima antes de la siguiente dosificación (C_{min}), con el objetivo de determinar el efecto mínimo biológico (a las concentraciones más bajas). En todas las circunstancias se obtienen también muestras de tejidos sustitutos (piel, células mononucleares periféricas) para poder correlacionar los hallazgos en tejidos tumorales con los hallazgos en estos

tejidos sustitutivos y, si se determina que son equivalentes, continuar el estudio con las muestras de tejidos sustitutivos más fáciles de obtener.

Una vez obtenidas estas muestras se determinan los análisis farmacodinámicos a realizar. Habitualmente incluyen la inhibición de la diana terapéutica de la proteína contra la cual va dirigida, la inhibición de alguna proteína efectora situada en un nivel más inferior de la cascada de señalización, la inhibición de la proliferación y/o la inducción de apoptosis, y si tenemos identificado algún potencial mecanismo de escape de la señal también efectuaremos la determinación de éste. Por ejemplo, si se trata de un fármaco dirigido a inhibir el Receptor del Factor de crecimiento Epidérmico (EGFR), miraremos antes y después de la administración de este fármaco el EGFR total, el EGFR activado o fosforilado -Fosfo-EGFR- (pEGFR), la pMAPK, el índice de proliferación (con la tinción de Ki67) y la apoptosis (con las tinciones TUNEL y determinación de caspasas). Estos análisis se hacen habitualmente con técnicas de inmunohistoquímica y se miden bien como porcentajes de expresión o con H-score. Comparando las puntuaciones de los diferentes biomarcadores antes y después de la administración del fármaco, sabremos como inhibe el fármaco la diana biológica y qué respuestas biológicas celulares produce.

Los resultados de estos estudios farmacodinámicos los correlacionaremos con los estudios farmacocinéticos estableciendo si hay una buena relación farmacocinética farmacodinámica. Con este proceso de modelización, y teniendo en cuenta las diferentes dosis administradas, podremos definir cuál es la mejor dosis y esquema de un determinado fármaco (figura 7).

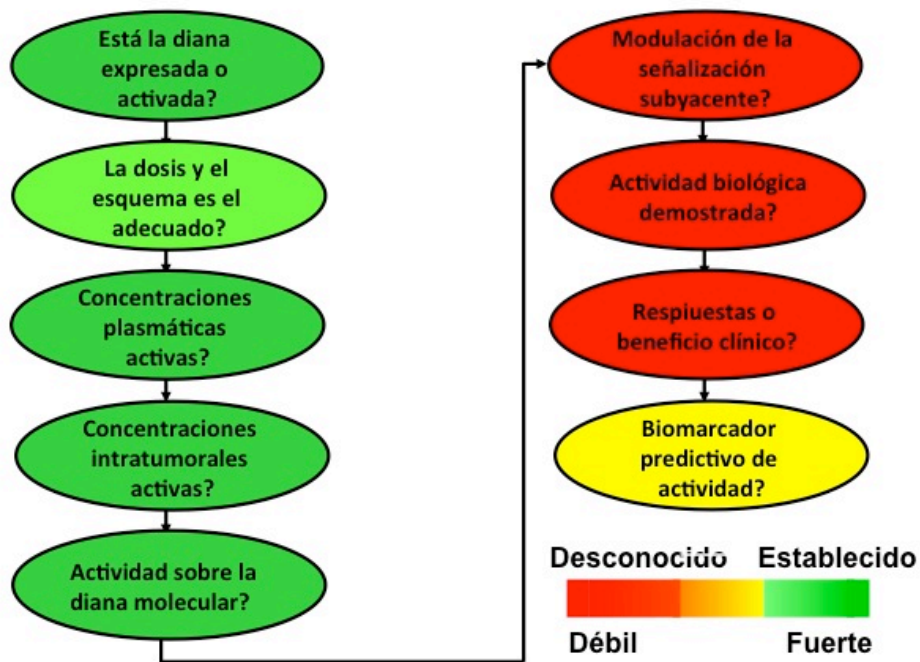


Figura 7. Esquema que reproduce los diferentes pasos del concepto farmacocinético-farmacodinámico de desarrollo precoz de nuevos fármacos en oncología.

ARTICULOS DE TESIS

ARTICULOS DE TESIS

Los trabajos presentados en los artículos de tesis siguen la línea del trabajo iniciado previamente en nuestro grupo sobre el desarrollo farmacocinético y farmacodinámico de fármacos dirigidos a dianas terapéuticas bien reconocidas en las vías de señalización proliferativa celular. Los resultados de los estudios farmacodinámicos los correlacionaremos con los estudios farmacocinéticos estableciendo si hay una buena relación farmacocinética-farmacodinámica. Con este proceso de modelización, y teniendo en cuenta las diferentes dosis administradas, definimos cuál es la mejor dosis y esquema de un determinado fármaco.

En esta tesis planteamos el desarrollo de los siguientes fármacos:

- 1.- BMS-214662, un inhibidor de la farnesil transferasa, proceso clave en la activación de la proteína pro-Ras a Ras activo³
- 2.- Everolimus (RAD001), un inhibidor de mTOR, proteína central en la señalización de la vía de PI3K⁴

Artículo de tesis (1). *Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Weekly 1-Hour and 24-Hour Infusion BMS-214662, a Farnesyltransferase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors. J Clin Oncol, 2005* ³

Artículo de tesis (2). *Dose- and Schedule-Dependent Inhibition of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway With Everolimus: A Phase I Tumor Pharmacodynamic Study in Patients With Advanced Solid Tumors.* J Clin Oncol, 2008 ⁴

RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados y discusión

Inhibición de la farnesil transferasa – BMS-214662

El conjunto de proteínas RAS (H-RAS, K-RAS, N-RAS) constituyen un elemento central crítico en la señalización iniciada por la activación de los receptores de tirosina quinasa, por lo que tienen un rol fundamental en un gran número de procesos celulares que incluyen el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis, la organización del citoesqueleto y el tráfico de membrana ^{17,51}. Tras la síntesis de la proteína Pro-RAS, una serie de procesos bioquímicos post-traslacionales convierten esta proteína inicialmente hidrofílica en una mucho más hidrofóbica que permita su localización en la parte interna de la membrana citoplasmática, la localización definitiva de RAS. El primero de esta serie de procesos es catalizado por el enzima farnesiltransferasa (FT), produciendo la unión covalente de un grupo farnesil a la secuencia CAAX C-terminal del residuo cisteína del propéptido Pro-RAS original. La farnesilación, al ser el proceso inicial de esta serie de modificaciones que precisa la molécula Pro-RAS, se considera el más crítico y el bloqueo de la actividad de esta enzima produce un severo deterioro de la función de RAS ⁵². Además la actividad de RAS está muy aumentada en las células neoplásicas con respecto a las células normales circundantes ⁵³.

Por todos estos motivos, uno de los primeros grupos de fármacos desarrollados para específicamente inhibir las señales de transducción celular fueron los inhibidores de la FT ^{27,54-58}. Inicialmente se pensó que estos fármacos eran especialmente específicos para las células con transformación o mutación de RAS ⁵⁹⁻⁶¹. Posteriormente se vio que los inhibidores de FT no son completamente selectivos para las formas mutadas de RAS, y por tanto pueden inhibir las formas nativas de RAS presentes en las células

normales⁶²⁻⁶⁷. Sin embargo, el hecho de que las células tumorales tengan concentraciones mucho más altas de RAS con respecto a las células normales⁵³, hace que este grupo de fármacos pueda considerarse bastante selectivo. Dos puntos importantes deben considerarse en la inhibición de la FT. En primer lugar, el primer paso de la activación de la molécula Pro-RAS a RAS también puede catalizarse, aunque en menor grado, por otro enzima llamado geranilgeraniltransferasa I (GGTI)^{68,69}. Esto hace que en ante algunas circunstancias la inhibición de las modificaciones post-traslacionales de RAS por parte los inhibidores de FT, las moléculas de RAS, especialmente K-RAS4B pueda ser susceptible de ser activada por el enzima GGTI⁷⁰. A pesar de esta activación alternativa, algunos inhibidores potentes de FT, son capaces de disminuir de forma muy importante la cantidad total de RAS activado. En este sentido algunos inhibidores de FT también son en menor grado inhibidores de GGTI. El segundo punto se refiere a la posible actividad de los inhibidores de FT en base a la inhibición de otras proteínas que también son clientes de los enzimas FT y GGTI, entre otras, RhoB y las proteínas asociadas al centrómero CENP-E y CENP-F⁷¹⁻⁷³.

El fármaco que nosotros hemos estudiado, BMS-214662, es una pequeña molécula no peptídica, inhibidor muy potente tanto de H-Ras como de K-Ras, siendo su IC50 de 1.3 y 8.4 nM, y su IC90 de 18 y 108 nM, respectivamente^{74,75}. A diferencia de otros inhibidores de FT, BMS-214662 se ha caracterizado en los modelos pre-clínicos por producir regresiones en modelos tumorales en xenoinjertos bien establecidos tanto en esquemas continuos como intermitentes, así como por inducir apoptosis tanto en células que están en fase de proliferación como en células quiescentes^{74,76}. Esto hace que este compuesto tenga unas propiedades sinérgicas con muchos citotóxicos utilizados habitualmente en el tratamiento de los pacientes con cáncer^{75,76}.

Los objetivos de este estudio en fase I con el fármaco BMS-214662 fueron identificar, mediante biomarcadores farmacodinámicos (en muestras tumorales y de piel), la dosis y el esquema de tratamiento más apropiado para el posterior desarrollo del mismo en patologías más específicas. En este sentido, nos planteamos correlacionar los hallazgos farmacodinámicos con los diferentes parámetros farmacocinéticos, tales como C_{max} (concentración máxima), T_{max} (tiempo a la concentración máxima), C_{min} (concentración mínima), AUC (área bajo la curva) y CL (aclaramiento), entre otros. El objetivo final era desarrollar un modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos para definir la dosis biológica óptima (DBO) y dosis recomendada (DR) para el desarrollo posterior del fármaco ³.

Resultados clínicos

El estudio se inició con la administración de BMS-214662 a dosis crecientes en una infusión semanal de 1 hora de duración, empezando con una dosis de 56 mg/m^2 (decidida en base a la toxicidad de los modelos en animales) hasta una dosis de 275 mg/m^2 , con un total de 7 niveles de dosis diferentes. En esta primera parte del estudio se incluyeron un total de 37 pacientes. El perfil de toxicidad observado con la administración de 1 hora incluyó toxicidad hematológica, en forma de plaquetopenia y leucopenia, y toxicidad no-hematológica en forma de náuseas, vómitos, diarrea y elevaciones transitorias (24-48 horas de duración de transaminasas). Debido a este perfil de toxicidad, y a los datos de los resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos que posteriormente mencionaremos, decidimos evaluar un segundo esquema de tratamiento en forma de una administración del fármaco en infusión continua de 24 horas también con una cadencia semanal. Las dosis exploradas en este nuevo esquema fueron desde 84 mg/m^2 hasta 492 mg/m^2 , con un total de 7 niveles de dosis diferentes. Con el esquema de infusión de 24 horas no se observaron toxicidades

hematológicas y las toxicidades no-hematológicas más frecuentes fueron, elevación de creatinina acompañadas en algunos casos de insuficiencia renal reversiblemente, náuseas y vómitos.

Resultados farmacocinéticos

El perfil farmacocinético de BMS-214662 objetivó un comportamiento lineal en todas las dosis evaluadas de los dos esquemas de tratamiento. Hubo una variabilidad interindividual considerable. El aclaramiento del fármaco (CL) fue muy elevado (388 mL/min/m², el volumen de distribución (V_{SS}) 32 l/m², y el tiempo de vida media (t_{1/2}) 2,91 horas.

Resultados farmacodinámicos

Inhibición de la actividad farnesiltransferasa

La correlación entre la inhibición de la actividad FT en las células mononucleares periféricas (PBMCs) y la dosis fue muy buena en los dos esquemas de tratamiento evaluados. En el esquema de 1 hora de duración se observó una inhibición mayor al 80% a dosis ≥ 118 mg/m², sin embargo el grado de actividad FT volvió a los niveles basales a las 24 horas de finalizar la infusión. Por el contrario, con el esquema de infusión de 24 horas se observó una inhibición sostenida durante todo el periodo de infusión del 40% a la dosis de 275 mg/m², siendo esta inhibición máxima (en torno al 70%) a la dosis de 370 mg/m².

De forma interesante se observó una muy buena correlación entre el perfil de exposición del fármaco y la intensidad de inhibición de la actividad FT en los PBMCs en los dos esquemas terapéuticos. El patrón de inhibición de la actividad FT causada por el fármaco fue muy consistente en los tres tejidos evaluados, PBMCs, tejido tumoral y

tejido adyacente en el tumor, aunque hubo una tendencia a una más prolongada inhibición en el tejido tumoral y el adyacente al tumoral con respecto a las PBMCs.

Efectos en la señal de transducción celular

Tras la administración de BMS-214662 no se observaron cambios en la expresión de MAPK total y fosforilada, Akt total y fosforilado, p27^{KIP1} y Ki67 en las muestras tumorales con respecto a los valores basales. Sin embargo, BMS-214662 indujo apoptosis en las muestras tumorales obtenidas durante y tras el tratamiento, tanto por tinción de hematoxilina-eosina como por tinción de TUNEL. De forma interesante el patrón de máxima inducción de apoptosis fue diferente dependiendo del esquema de tratamiento administrado. Así, en el esquema de 1 hora de duración la inducción de apoptosis fue superior a las 24 horas que a las 2 horas de finalizar el tratamiento. En el esquema de infusión de 24 horas, la inducción de apoptosis fue superior a las 48 horas, que a las 24 horas y las 6 horas de haber iniciado el tratamiento. El mismo patrón evolutivo se observó en la inducción de *cleaved caspases* 3 y 9, las cuáles se incrementaron con el tratamiento siguiendo los mismos patrones de temporalidad que la tinción de TUNEL.

La inducción de apoptosis se relacionó con la dosis en el esquema de infusión de 1 hora, observándose en todos los pacientes tratados a dosis ≥ 209 mg/m². Por el contrario la inducción de apoptosis no se relacionó con la dosis en los pacientes tratados con el esquema de infusión de 24 horas.

Interpretación farmacocinética-farmacodinámica

El desarrollo clínico de BMS-214662 se realizó con una administración semanal al ser los modelos preclínicos más favorables en este sentido. El objetivo de este estudio fue

identificar el esquema semanal más favorable en base al perfil de toxicidad, el patrón farmacocinético del fármaco y la evaluación farmacodinámica en base a la inhibición de la actividad FT y la inducción de apoptosis tanto en el tejido tumoral como en los tejidos sanos utilizados como referencia. A raíz del estudio pudimos constatar que tanto los perfiles de toxicidad, como los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos fueron muy diferentes con el esquema de 1 hora y el esquema de 24 horas.

Tras evaluar el esquema de infusión de 1 hora procedimos a evaluar el esquema de 24 horas por diferentes motivos. En primer lugar, la exposición al fármaco (AUC) alcanzada con el esquema de 1 hora a la dosis recomendada (DR) de 209 mg/m² fue de 27 $\mu\text{M} \times \text{h}$, la cual era muy inferior a la sugerida en los modelos preclínicos para conseguir actividad antitumoral (77 $\mu\text{M} \times \text{h}$). Además las toxicidades observadas con este esquema de 1 hora estaban más relacionadas con la concentración máxima (C_{max}) que con la AUC, por lo que se anticipó que una exposición mayor podría ser conseguida con la administración continua durante 24 horas de forma semanal. En segundo lugar, a la DR de la infusión de 1 hora, la inhibición de la actividad FT en las células tumorales era casi completa pero muy corta (≤ 6 horas), probablemente debido a la vida media corta del fármaco (en torno a las 3 horas). De nuevo era previsible que una infusión más larga del fármaco resultará en una inhibición más prolongada de la actividad FT. En tercer lugar, en modelos preclínicos adicionales que se desarrollaron al conocer los primeros resultados clínicos farmacocinéticos y farmacodinámicos, el índice terapéutico de BMS-214662 se incrementó con la prolongación del tiempo de exposición. En modelos *in vitro*, la exposición (AUC) requerida para conseguir una IC50 se redujo de forma muy sustancial cuando el tiempo de exposición se incrementó de 6 horas a 24 horas: 100 veces para las células proliferantes y 10 veces para las células quiescentes. Igualmente, en modelos *in vivo*, la mínima AUC efectiva fue de 29 $\mu\text{M} \times \text{h}$

cuando BMS-214662 se administró en una infusión de 24 horas y de 77 $\mu\text{M} \times \text{h}$ cuando se administró en 1 hora.

La administración de BMS-214662 en infusión de 24 horas se tradujo en una práctica desaparición de la toxicidad relacionada con la C_{max} , aunque aparecieron algunas toxicidades más relacionadas con la prolongada exposición al fármaco como la insuficiencia renal, pero globalmente el perfil de toxicidad fue más favorable con la infusión de 24 horas.

Más importante, desde un punto de vista farmacodinámico-farmacocinético, la administración en 24 horas se consideró la más óptima por tres motivos adicionales. En primer lugar, a la DR de 275 mg/m^2 se obtuvo una exposición $\geq 30 \mu\text{M}$, que era consistente con la exposición necesaria para obtener actividad en los modelos preclínicos. En segundo lugar, la infusión de 24 horas proporciona una más prolongada inhibición de la FT que la infusión de 1 hora. Y por último, la infusión de 24 horas produce mayores niveles de apoptosis tumoral que la infusión de 1 hora.

De forma muy novedosa, nuestro estudio fue el primero en determinar el grado de inhibición de la actividad FT y de inducción de apoptosis en el tejido tumoral humano. Estudios previos con otros fármacos habían observado la inhibición de la actividad FT en PBMCs y en células de la mucosa oral^{77,78} pero se desconocía hasta el momento el impacto que estos fármacos inhibidores de FT podían producir en los tumores humanos. Nosotros pudimos demostrar la existencia de una muy buena correlación entre el nivel de inhibición de la actividad FT y su dependencia temporal entre el tumor y los tejidos normales de referencia.

En el estudio fuimos capaces de demostrar que la actividad del fármaco venía mediada por la activación de la vía de las caspasas (con un incremento en la expresión de las *cleaved caspases 3 y 9*) pero no se observó ningún grado de inhibición de la señalización de la vía de MAPK. De forma adicional demostramos los efectos biológicos del resultado de la activación de la vía de las caspasas con un incremento en la apoptosis celular medida por tinciones de hematoxilina/eosina y TUNEL sin alteración en la proliferación celular –no observándose cambios en la expresión de Ki67 y p27^{KIP1}– dato concordante con la ausencia de inhibición de MAPK. Este hallazgo ha sido corroborado por otros autores en modelos preclínicos ^{67,79-81}.

Conclusiones

En este estudio fase I farmacodinámico-farmacocinético de BMS-214662, un inhibidor potente de la actividad FT tumoral, el esquema recomendado para posterior desarrollo del fármaco es la infusión semanal de 24 horas de duración, a la dosis recomendada de 275 mg/m². Con este esquema y esta dosis se consigue el mejor perfil de seguridad y la máxima y más prolongada inhibición de la actividad FT e inducción de apoptosis en las muestras tumorales obtenidas en el estudio. El fármaco BMS-214662 ha continuado posterior desarrollo clínico con este esquema y dosis de administración, tanto como agente único como en combinación con otros fármacos citotóxicos y biológicos, siendo especialmente activo en procesos hematológicos linfoproliferativos ⁸²⁻⁸⁶.

Resultados y discusión

Inhibición de mTOR (mammalian target of rapamycin) – Everolimus (RAD001)

La proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*) es una quinasa serina/treonina que constituye un efector central en la señalización de la vía de PI3K (fosfatidil inositol 3-quinasa) por debajo de PI3K y de Akt^{87,88}. mTOR se activa en respuesta a diferentes estímulos incluyendo factores de crecimiento –que activan receptores situados a nivel de la membrana celular- y nutrientes⁸⁹. Con el compromiso de PI3K y de Akt, la activación de mTOR desencadena una señalización a diferentes proteínas reguladoras favoreciendo la traslación de RNA mensajero (mRNA) codificante de proteínas esenciales para el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular de G1 a la fase S^{44,88,90}. En base a esta posición única central de mTOR en esta señalización celular, mTOR es considerado una diana clave para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento del cáncer^{88,91,92}. De forma muy importante la señalización mediada por PI3K-Akt-mTOR está alterada en un gran número de tumores humanos. Más del 50% de los tumores humanos tienen algún tipo de desregulación a este nivel^{44,87,93}. Además la señalización de un mTOR es una pieza fundamental en el proceso de angiogénesis⁹⁴⁻⁹⁸.

mTOR señala como mínimo a dos efectores, la proteína de unión (4E-BP1) de la proteína represora traslacional factor iniciador eucariota 4E (eIF-4E) y la proteína ribosomal S6 quinasa (S6K1)⁹⁹⁻¹⁰¹. Con respecto a la primera, la unión de 4E-BP1 a eIF-4E está modulada por una fosforilación dependiente de mTOR de múltiples residuos serina y treonina^{102,103}. Después de una fosforilación en el residuo Ser65, 4E-

BP1 se disocia de eIF4E, permitiendo la reconstitución de un complejo de factores de iniciación de traslación competentes con el compromiso de eIF-4F¹⁰⁴ y de eIF-4G¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. La activación de eIF-4F induce la traslación de un subgrupo de mRNAs *capped* que contienen regiones altamente estructuradas 5'-no trasladadas y proteínas codificantes involucradas en la transición de la fase G1 a la fase S^{108,109}.

El fármaco que hemos estudiado, everolimus o RAD 001 es un derivado oral de la rapamicina que ha demostrado actividad antiproliferativa potente frente una gran variedad de células eucariotas. Everolimus es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos activados por citoquinas así como la proliferación de células tumorales humanas en modelos preclínicos tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos con xenoinjertos¹¹⁰⁻¹¹⁴. Como resultado de estas propiedades, everolimus se desarrolló inicialmente como agente inmunosupresor^{115,116} y ahora está siendo desarrollado como agente antitumoral en múltiples patologías.

En modelos preclínicos everolimus ha demostrado actividad antitumoral dosis-dependiente en ambos casos tanto en administración continua como en administración intermitente. Con ambos esquemas everolimus ha demostrado inhibir las señalizaciones dependientes de la fosforilación de 4E-BP1 y de S6K1 tanto en tejidos normales como en tejidos tumorales¹¹².

El hecho de determinar cuál es el mejor esquema de administración y la dosis adecuada de everolimus en pacientes con cáncer constituía una pregunta fundamental por tres motivos muy importantes. En primer lugar, la actividad de este fármaco puede venir condicionada en algunos tumores por la administración de everolimus como agente único, pero en la mayoría de tumores el papel crítico de este fármaco vendrá

determinado por su uso en combinación con otros fármacos dirigidos a dianas terapéuticas, tratamiento hormonales o citotóxicos. En este sentido para obtener el mayor grado de sinergia evitando al máximo efectos tóxicos necesitamos conocer con la mayor precisión cuál es el esquema y dosis recomendados que se traducen en una dosis óptima biológica (DOB) en base a la actividad farmacodinámica y farmacocinética. En segundo lugar, sabíamos por los modelos preclínicos existentes que las dosis de everolimus necesarias para producir actividad antitumoral eran muy superiores a las necesarias para un efecto inmunosupresor ¹¹⁰⁻¹¹². En tercer lugar, en base a la experiencia clínica previa de otro inhibidor de mTOR, temsirolimus, que se había desarrollado de una forma muy anárquica en los estudios en fase I sin tener una buena correlación farmacodinámica-farmacocinética ¹¹⁷⁻¹¹⁹, hecho que llevó a un desarrollo muy limitado del producto, teníamos una necesidad imperiosa de acotar al máximo la DOB de este fármaco.

Los objetivos de este estudio en fase I con el fármaco everolimus fueron por tanto identificar, mediante biomarcadores farmacodinámicos (en muestras tumorales y de piel), la dosis y el esquema de tratamiento más apropiado para el posterior desarrollo del mismo en patologías más específicas. En este sentido, nos planteamos correlacionar los hallazgos farmacodinámicos con el perfil farmacocinético de cada paciente motivo por el cual hicimos hincapié en determinar de forma consecutiva las concentraciones mínimas (C_{min}) para poder realizar una modelización entre la mínima exposición y los hallazgos farmacodinámicos. Además disponíamos de una completa caracterización del perfil farmacocinético de everolimus en otro estudio realizado paralelamente al nuestro ^{120,121}. El objetivo final era desarrollar un modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos para definir la DBO y la dosis recomendada (DR) para el desarrollo posterior del fármaco ⁴.

Resultados clínicos

Este estudio fase I de everolimus se realizó en dos cohortes paralelas de pacientes afectos de cáncer avanzado sin posibilidades de tratamiento activo eficaz, administrándose el fármaco por vía oral una vez al día de forma semanal o de forma diaria. Se incluyeron en el estudio un total de 55 pacientes. En el esquema semanal se estudiaron tres niveles de dosis diferentes: 20, 50 y 70 mg. En el esquema diario se estudiaron dos niveles de dosis diferentes: 5 y 10 mg. En el esquema semanal la dosis de 70 mg se consideró excesivamente tóxica ya que 4 pacientes de los 7 incluidos presentaron toxicidades consideradas relevantes (toxicidades limitantes de dosis) tales como mucositis (2 pacientes), neutropenia e hiperglicemia, todas ellas reversibles. En el esquema diario únicamente un paciente presentó una toxicidad considerada limitante de dosis en forma de mucositis también reversible.

Con respecto a la actividad clínica, aunque este no es el objetivo primario de un estudio fase I, se observaron signos de actividad clínica con respuesta o control de la enfermedad en pacientes con cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer renal avanzados.

Resultados farmacocinéticos

El perfil farmacocinético de everolimus mostró una relación lineal entre las dosis y las concentraciones mínimas (C_{\min}) observadas en el momento anterior a la siguiente dosificación, especialmente en el esquema diario. En el esquema semanal, debido al número limitado de puntos en los que se obtuvieron muestras para farmacocinética, no se pudo observar esta relación aunque la tendencia a la misma era evidente.

Resultados farmacodinámicos

Inhibición en diferentes grados de la señalización de mTOR se observó en todos los niveles de dosis y en los dos esquemas de tratamiento evaluados. Uno de los esfuerzos notables de este estudio es que se pudieron analizar un total de 30 muestras pareadas de tumor (basal y durante el tratamiento) y 43 muestras pareadas de piel (basal y durante el tratamiento). En el esquema diario las muestras durante el tratamiento se obtuvieron en la cuarta semana de tratamiento antes de la administración diaria del fármaco. En el esquema semanal, con el objetivo de poder determinar si la inhibición observada tras la administración del fármaco se mantenía a lo largo del intervalo entre dosis, se consideró adecuado efectuar dos biopsias en el curso del tratamiento, una a las 24 horas tras la cuarta dosis y una a los seis días de esta misma dosis y justo un día antes de la dosis siguiente.

Globalmente, considerando todos los pacientes evaluables para el estudio farmacodinámico, el tratamiento con everolimus produjo una inhibición casi completa de las formas fosforiladas (activas) de S6 y de eIF-4G, tanto en el tumor como en la piel. Se obtuvo una inhibición de p4E-BP1 más profunda en la piel que en las muestras de tumor. De forma paradigmática se observó una activación de Akt (pAkt) tanto en los tumores como en la piel en el residuo Ser473, hecho de crucial importancia y que describiremos con mayor detalle posteriormente. De forma importante descartamos que las variaciones en la expresión de las proteínas fosforiladas (activadas) debido al tratamiento no se debieran a una variación en el valor absoluto de la proteína total a consecuencia del tratamiento. Como efectos biológicos sobre las células observamos una disminución de la proliferación celular tanto en las muestras de tumor como en la piel con la expresión de Ki67.

Con el objetivo de analizar de manera pormenorizada la contribución de cada esquema y de cada nivel de dosis en estos resultados farmacodinámicos hicimos una disección de los mismos de forma individual. Aunque los resultados obtenidos en las muestras de piel se correlacionan bastante con los obtenidos en las muestras de tumor para la mayoría de marcadores utilizados, me refiero en el párrafo a continuación únicamente a los datos de las muestras tumorales. En el esquema diario, la inhibición de pS6 fue casi completa en los dos lugares de fosforilación (Ser 235/6; Ser 240/4) a los dos niveles de dosis (5 y 10 mg) pero la inhibición de pEIF-4g fue solo parcial a la dosis de 5 mg y completa a la dosis de 10 mg. La reducción de la fosforilación de p4E-BP1 fue más profunda a la dosis de 10 que a la dosis de 5 mg. En ambos niveles de dosis se observó una disminución de la proliferación (Ki67) en la mayoría de los pacientes y un incremento de la fosforilación de Akt en el residuo Ser473 en la mitad de los pacientes en los dos niveles de dosis.

En el esquema semanal, la inhibición de la señalización dependiente de mTOR fue evaluada a las 24 horas (efecto inmediato) y 24 horas antes de la siguiente dosificación (efecto tardío). La inhibición de pS6 inmediata y tardía para los dos residuos de fosforilación fue profunda y por tanto mantenida en los tres niveles de dosis evaluados (20, 50 y 70 mg). La inhibición inmediata de pEIF-4G fue completa en todos los niveles de dosis pero la inhibición sostenida (efecto tardío) sólo se observó en las dosis de 50 y 70 mg. La inhibición de p4E-BP1, al igual que en el esquema continuo, no se observó en todos los pacientes, pero en los que se observó ésta fue mantenida, no observándose claras diferencias entre los tres niveles de dosis. La activación de pAkt sólo se observó a dosis ≥ 50 mg pero no se sostuvo en el tiempo (no

efecto tardío). La proliferación celular tumoral disminuyó en la mayoría de pacientes sobre todo a dosis ≥ 50 mg pero se sostuvo en el tiempo.

El hecho de que a población base de este estudio está constituida por pacientes refractarios a los tratamientos disponibles y que el número de pacientes que presentan beneficio clínico es limitado no ha permitido establecer ninguna correlación sobre el potencial valor predictivo de actividad en ninguno de los biomarcadores evaluados.

Modelización farmacodinámica-farmacocinética

A pesar de la limitación en las muestras farmacocinéticas obtenidas en el estudio, pudimos hacer una modelización farmacodinámica-farmacocinética entre los efectos farmacodinámicos en tumor y en piel y las C_{\min} en los pacientes tratados en el esquema continuo. Esto es debido a que en el esquema continuo se ha demostrado una buena correlación entre las concentraciones mínimas (C_{\min}) y la exposición (AUC). El hecho de que la inhibición de pS6 fuera casi completa en todos los pacientes tratados en los dos niveles de dosis diarios (5 y 10 mg) hace imposible hacer ningún tipo de modelización siendo este marcador demasiado sensible al efecto inhibitorio de everolimus. Una buena correlación se observó entre las C_{\min} y la inhibición de pEIF-4G y p4E-BP1, demostrando este hecho también que la dosis de 10 mg (a la que corresponden los pacientes que tenían C_{\min} superiores era más activa farmacodinamicamente en la inhibición de los parámetros menos sensibles a la acción del everolimus. No se pudo observar ninguna tendencia de correlación entre los valores de C_{\min} y la activación de pAkt.

Interpretación farmacodinámica-farmacocinética

El desarrollo clínico de everolimus (RAD001) en pacientes con cáncer se inició con este estudio fase I farmacodinámico-farmacocinético paralelamente a otro estudio fase I para determinar cual era el mejor esquema de tratamiento y la dosis recomendada para el posterior desarrollo del everolimus tanto como agente único como en combinación con otros fármacos ^{120,121}. El objetivo principal era definir la DOB que obtuviera una inhibición completa y sostenida de la señalización mediada por mTOR en las muestras de tumor y de la piel, con un perfil de seguridad favorable. Estudios preclínicos previos con everolimus y otros inhibidores de mTOR habían sugerido que el tratamiento con estos fármacos producía una modulación de diferentes efectores de la vía de mTOR en muestras de tumor, piel y PBMCs. Sin embargo, los resultados no eran completamente concordantes entre los diferentes estudios realizados ^{112,119}. Esta discordancia manifiesta en estos estudios, junto con el hecho de la discreta reproducibilidad entre los modelos de laboratorio y los tumores humanos, nos llevaron a realizar este estudio evaluando dos esquemas diferentes de administración oral (diaria y semanal) evaluando aspectos claves del perfil farmacocinético del mismo y una profunda evaluación de las dos señalizaciones más importantes dependientes de mTOR, la vía de 4E-BP1 (midiendo la expresión total y fosforilada de 4E-BP1, y pEIF-4G) y la vía de S6K1 (midiendo los valores totales y fosforilados de S6), así como la potencial activación superior de la misma vía a consecuencia del tratamiento con everolimus (mediante la medición de la expresión de pAkt) y las respuesta biológica en la proliferación de las células (Ki67) tanto en muestras de tumor como de piel. Por último, con el objetivo de interpretar los hallazgos de una forma más consistente hemos hecho una modelización farmacocinética-farmacodinámica de los datos obtenidos.

Varios hallazgos importantes se desprenden de este estudio. En primer lugar, los hallazgos observados tras la administración de everolimus en la piel y en el tumor son muy consistentes para la mayoría de los biomarcadores por lo que la piel puede ser un buen sustituto para la evaluación de la actividad farmacodinámica de los inhibidores de mTOR.

En segundo lugar, teniendo en cuenta la necesidad de obtener una máxima inhibición de las vías dependientes de mTOR, sólo las dosis de 10 mg en el esquema diario y las dosis de 50 y 70 mg en el esquema semanal producen una inhibición completa y mantenida de pS6 y de peIF4G, este último siendo el marcador más discriminativo de la inhibición profunda de la señalización de mTOR ^{113,114}.

En tercer lugar hemos descrito en este estudio la activación secundaria que la inhibición de mTOR produce en Akt con un incremento en los niveles de expresión de pAkt en el residuo 473 en una proporción de los pacientes tratados. Éste es un hecho muy importante ya que esta activación secundaria de Akt, aunque no es persistente en el tiempo en el esquema semanal, puede explicar la resistencia que algunos tumores puede tener al tratamiento con inhibidores de mTOR análogos de la rapamicina. Hoy en día sabemos que esta activación de Akt se produce por un feed-back que viene regulado por la inhibición de la proteína S6K1 por el everolimus, la cual anula la inhibición de la regulación negativa que en condiciones normales S6K1 produce sobre IRS-1, molécula adaptadora ente el IGF-1R y PI3K. Este hallazgo ha sido descrito por nuestro grupo y por otros grupos en modelos preclínicos ^{112,122}. Este es un hecho de los inhibidores de mTOR análogos de la rapamicina que únicamente son capaces inhibir el complejo mTORC1 pero no el complejo mTORC2. Hoy en día existe otros fármacos con un mecanismo de acción diferente –inhibición catalítica- que son capaces de inhibir la

formación de los complejos mTORC1 y mTORC2 y que están siendo evaluados en estudios clínicos muy preliminares ¹²³. Alternativamente también se están desarrollando combinaciones de inhibidores de mTOR análogos de la rapamicina con fármacos que inhiben la activación secundaria de la vía de IGF-1R a un nivel superior, tales como anticuerpos dirigidos al IGF-1R. En este sentido nuestro grupo ha demostrado la factibilidad de la combinación del inhibidor de mTOR ridaforolimus con el anticuerpo monoclonal inhibidor de IGF-1R dalotuzumab en un estudio fase I-II demostrando actividad muy prometedora en pacientes con cáncer de mama subtipo Luminal B refractarias a los tratamientos convencionales ^{124,125}.

Por último, la modelización farmacocinética-farmacodinámica ha permitido establecer la correlación entre las concentraciones mínimas del fármaco y la inhibición de pEIF-4G y p4E-BP1 en el tumor, siendo estos biomarcadores los que mejor discriminan el efecto del fármaco en esta correlación, por lo que sugerimos que son los marcadores que deberían utilizarse en ulteriores modelizaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas con inhibidores de mTOR.

En resumen, este exhaustivo análisis farmacocinético-farmacodinámico, nos ha permitido diseccionar los mecanismos de acción y algunos potenciales mecanismos de resistencia de everolimus en el tratamiento de pacientes con tumores avanzados, así como definir las dosis óptimas biológicas de los esquemas evaluados.

Conclusiones

En este estudio fase I farmacodinámico-farmacocinético de everolimus (RAD001), un inhibidor potente de mTOR, hemos determinado que desde el punto de vista farmacodinámico everolimus puede recomendarse en el esquema diario a la dosis de

10 mg al día y en el esquema semanal a la dosis de 50 mg, dado que la dosis de 70 mg, aunque también adecuada desde el punto de vista farmacodinámico presenta un perfil de toxicidad excesivo. Con respecto a los dos esquemas, aunque los resultados aportados en este estudio permiten recomendar ambos, el esquema semanal produce una inhibición más continuada de la señalización.

En este sentido el desarrollo posterior de este fármaco ha seguido mayoritariamente la dosis diaria de 10 mg al día. Un estudio fase II randomizado posterior que ha evaluado la dosis de 10 mg diarios o 50 mg semanales en pacientes con cáncer de mama avanzado ha determinado de forma inequívoca que tanto por el perfil de seguridad como por la actividad del mismo el esquema diario es el más recomendable para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos ¹²⁶.

Everolimus ha tenido un desarrollo posterior muy amplio en pacientes con tumores sólidos hecho que ha conducido a la aprobación regulatoria del mismo en varias situaciones, incluyendo el cáncer de células renales avanzado y resistente a inhibidores de VEGFR ¹²⁷, los tumores neuroendocrinos pancreáticos ¹²⁸, los pacientes afectados del síndrome de esclerosis tuberosa con astrocitomas sub-ependimales ¹²⁹ y muy recientemente las pacientes con cáncer de mama hormonodependientes refractarias al tratamiento hormonal convencional en combinación con letrozol ¹³⁰.

Creemos que este desarrollo exhaustivo de este fármaco en las indicaciones anteriormente mencionadas ha tenido su éxito en parte debido a este estudio fase I que fue capaz de determinar el esquema y la dosis de tratamiento adecuados no sólo en base a los criterios clásicos de los estudios fase I convencionales asociando a estos los resultados de los estudios farmacodinámicos y la modelización farmacocinética-

farmacodinámica que ha permitido discernir el grado más exhaustivo de inhibición de la señalización mediada por mTOR y aportar información acerca de algunos de los mecanismos de resistencia al mismo ¹³¹.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1) La activación incontrolada de las vías de señalización proliferativas constituye una de las características que definen a las células malignas y las diferencia de las células sanas. El conocimiento exhaustivo de las diferentes proteínas integrantes de las mismas, desde los receptores de superficie hasta las proteínas efectoras que transmiten la señalización al núcleo celular para iniciar el proceso de transcripción, así como los mecanismos de activación de las mismas, las alteraciones genómicas y epigenómicas que conducen a su disregulación en ciertos tipos tumorales, y la conectividad entre ellas y los mecanismos de resistencia primaria y adquirida a la manipulación farmacológica de las mismas constituye una fuente de posibilidades de intervención terapéutica para inhibir el crecimiento tumoral.
- 2) Las vías de señalización de RAS-RAF-MEK-MAPK y de PI3K-Akt-mTOR constituyen los dos sistemas más activos en la inducción de la proliferación y el crecimiento celular, así como en la inhibición de la apoptosis. Estas dos vías son además las más frecuentemente desreguladas en pacientes con cáncer por múltiples mecanismos, como amplificaciones, deleciones y translocaciones cromosómicas o mutaciones en oncogenes que condicionan adicción y mutaciones en genes supresores que suelen condicionar pérdida de función.
- 3) Múltiples fármacos dirigidos contra dianas específicas están siendo activamente estudiados en modelo pre-clínicos y en estudios clínicos con el objetivo de modificar estas disregulaciones y conducir a la célula maligna hacia la muerte celular o hacia la "normalización" de la homeostasis.

- 4) Los estudios clínicos iniciales (fase I/II) que incluyen la evaluación de los perfiles cinéticos asociados a la evaluación farmacodinámica de la acción del fármaco sobre el tumor y tejidos sanos correspondientes constituyen sin ninguna duda una herramienta imprescindible para poder optimizar el desarrollo de estos fármacos, permitiendo un desarrollo más eficiente. En uno de los estudios con fármacos objeto de esta tesis, el everolimus, el desarrollo apropiado del mismo tanto en la fase preclínica como en la fase clínica inicial ha permitido un desarrollo clínico exitoso en diversas neoplasias con la consiguiente aprobación del mismo por las diferentes agencias reguladoras.

- 5) Los inhibidores de mTOR análogos de la rapamicina son un grupo de fármacos bien establecidos con un mecanismo de acción muy central en la vía de señalización de PI3K-Akt-mTOR. Everolimus, es el fármaco paradigmático de este grupo. Ha tenido un desarrollo clínico óptimo, con una adecuada evaluación farmacocinética-farmacodinámica desde el primer estudio clínico en pacientes afectados de neoplasias. Fruto de los resultados de este estudio, el esquema recomendado es la administración diaria a la dosis de 10 mg al día. Esta dosis tiene la mejor relación farmacocinética-farmacodinámica con una inhibición profunda de la señalización con un perfil de seguridad más favorable.

- 6) A pesar de ser RAS una proteína clave en la señalización de RAS-RAF-MEK-MAPK, el bloqueo con inhibidores del enzima farnesiltransferasa, no se ha traducido en un desarrollo de estos fármacos en el tratamiento de pacientes con tumores sólidos. Sin embargo algunos de los inhibidores de la farnesiltransferasa, entre los que se incluye BMS-214662, siguen su desarrollo

clínico en pacientes con síndromes linfoproliferativos. El esquema más apropiado de BMS-214662 es la administración en infusión continua semanal a la dosis de 275 mg/m². Como hallazgo farmacodinámico importante, el mecanismo de acción biológico de los inhibidores de la farnesiltransferasa incluyendo BMS-214662, da lugar a una respuesta celular de inducción de la apoptosis.

BIBLIOGRAFIA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
3. Tabernero J, Rojo F, Marimon I, Voi M, Albanell J, Guix M, Vazquez F, Carulla J, Cooper M, Andreu J, Van Vreckem A, Bellmunt J, Manne V, Manning JA, Garrido C, Felip E, Del Campo JM, Garcia M, Valverde S, Baselga J. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of weekly 1-hour and 24-hour infusion BMS-214662, a farnesyltransferase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:2521-33.
4. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebwohl D, Baselga J. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:1603-10.
5. Brivanlou AH, Darnell JE, Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 2002;295:813-8.
6. Fey D, Croucher DR, Kolch W, Kholodenko BN. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Frontiers in physiology* 2012;3:355.
7. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature reviews Cancer* 2009;9:463-75.
8. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117-34.

9. Simon MA. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 2000;103:13-5.
10. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001;2:127-37.
11. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews Cancer* 2005;5:341-54.
12. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cellular signalling* 2005;17:1183-93.
13. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular cell* 2003;12:541-52.
14. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002;110:775-87.
15. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002;110:669-72.
16. Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002;110:763-73.
17. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews Cancer* 2003;3:459-65.
18. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-25.

19. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent progress in hormone research* 2001;56:127-55.
20. Kerkhoff E, Rapp UR. The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. *Advances in enzyme regulation* 2001;41:261-7.
21. Marais R, Marshall CJ. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer surveys* 1996;27:101-25.
22. Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in biochemical sciences* 2006;31:268-75.
23. Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews Molecular cell biology* 2005;6:827-37.
24. Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nature reviews Molecular cell biology* 2002;3:30-40.
25. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics* 2006;7:606-19.
26. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655-7.
27. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27:5497-510.
28. Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Current opinion in genetics & development* 2010;20:87-90.
29. Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. *Oncotarget* 2010;1:530-43.

30. Dienstmann R, Rodon J, Markman B, Tabernero J. Recent developments in anti-cancer agents targeting PI3K, Akt and mTORC1/2. Recent patents on anti-cancer drug discovery 2011;6:210-36.
31. Toker A, Newton AC. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. Cell 2000;103:185-8.
32. Lee JY, Engelman JA, Cantley LC. Biochemistry. PI3K charges ahead. Science 2007;317:206-7.
33. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. Nature reviews Molecular cell biology 2012;13:283-96.
34. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? Nature reviews Drug discovery 2004;3:711-5.
35. Walker I, Newell H. Do molecularly targeted agents in oncology have reduced attrition rates? Nature reviews Drug discovery 2009;8:15-6.
36. Sarker D, Pacey S, Workman P. Use of pharmacokinetic/pharmacodynamic biomarkers to support rational cancer drug development. Biomarkers in medicine 2007;1:399-417.
37. Sarker D, Workman P. Pharmacodynamic biomarkers for molecular cancer therapeutics. Advances in cancer research 2007;96:213-68.
38. Goulart BH, Clark JW, Pien HH, Roberts TG, Finkelstein SN, Chabner BA. Trends in the use and role of biomarkers in phase I oncology trials. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2007;13:6719-26.
39. Vilar E, Tabernero J. Cancer: Pinprick diagnostics. Nature 2012;486:482-3.

40. Tan DS, Thomas GV, Garrett MD, Banerji U, de Bono JS, Kaye SB, Workman P. Biomarker-driven early clinical trials in oncology: a paradigm shift in drug development. *Cancer J* 2009;15:406-20.
41. Workman P. Auditing the pharmacological accounts for Hsp90 molecular chaperone inhibitors: unfolding the relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Molecular cancer therapeutics* 2003;2:131-8.
42. Yap TA, Sandhu SK, Workman P, de Bono JS. Envisioning the future of early anticancer drug development. *Nature reviews Cancer* 2010;10:514-23.
43. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.
44. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews Cancer* 2002;2:489-501.
45. Vogt PK. PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends in molecular medicine* 2001;7:482-4.
46. Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nature cell biology* 2002;4:E65-8.
47. Reinhardt HC, Jiang H, Hemann MT, Yaffe MB. Exploiting synthetic lethal interactions for targeted cancer therapy. *Cell Cycle* 2009;8:3112-9.
48. Kaelin WG, Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2005;5:689-98.
49. Iglehart JD, Silver DP. Synthetic lethality--a new direction in cancer-drug development. *The New England journal of medicine* 2009;361:189-91.

50. Le Tourneau C, Lee JJ, Siu LL. Dose escalation methods in phase I cancer clinical trials. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101:708-20.
51. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research* 1989;49:4682-9.
52. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993;366:643-54.
53. Albanell J, Rojo F, Sonnichsen D, Manne V, Meeker J, Dendler R, Manning JA, Tabernero J, Baselga J. Elevated farnesyltransferase activity in chemo-naive breast cancer tissue as compared to normal surrounding tissue. *Proceedings of the American Society for Cancer Research* 2001;42:489 (Abstract 2634).
54. Cox AD, Der CJ. Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? *Biochimica et biophysica acta* 1997;1333:F51-71.
55. Gibbs JB, Graham SL, Hartman GD, Koblan KS, Kohl NE, Omer CA, Oliff A. Farnesyltransferase inhibitors versus Ras inhibitors. *Current opinion in chemical biology* 1997;1:197-203.
56. Gibbs JB, Oliff A. The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology* 1997;37:143-66.
57. Lerner EC, Hamilton AD, Sebti SM. Inhibition of Ras prenylation: a signaling target for novel anti-cancer drug design. *Anti-cancer drug design* 1997;12:229-38.
58. Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999;17:3631-52.

59. James GL, Goldstein JL, Brown MS, Rawson TE, Somers TC, McDowell RS, Crowley CW, Lucas BK, Levinson AD, Marsters JC, Jr. Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of Ras farnesylation in animal cells. *Science* 1993;260:1937-42.
60. Kohl NE, Mosser SD, deSolms SJ, Giuliani EA, Pompiano DL, Graham SL, Smith RL, Scolnick EM, Oliff A, Gibbs JB. Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. *Science* 1993;260:1934-7.
61. Kohl NE, Omer CA, Conner MW, Anthony NJ, Davide JP, deSolms SJ, Giuliani EA, Gomez RP, Graham SL, Hamilton K, et al. Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nature medicine* 1995;1:792-7.
62. Du W, Lebowitz PF, Prendergast GC. Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Molecular and cellular biology* 1999;19:1831-40.
63. Du W, Lebowitz PF, Prendergast GC. Elevation of alpha2(I) collagen, a suppressor of Ras transformation, is required for stable phenotypic reversion by farnesyltransferase inhibitors. *Cancer research* 1999;59:2059-63.
64. Law BK, Norgaard P, Moses HL. Farnesyltransferase inhibitor induces rapid growth arrest and blocks p70s6k activation by multiple stimuli. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:10796-801.
65. Lebowitz PF, Prendergast GC. Non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. *Oncogene* 1998;17:1439-45.
66. Lebowitz PF, Sakamuro D, Prendergast GC. Farnesyl transferase inhibitors induce apoptosis of Ras-transformed cells denied substratum attachment. *Cancer research* 1997;57:708-13.

67. Jiang K, Coppola D, Crespo NC, Nicosia SV, Hamilton AD, Sebti SM, Cheng JQ. The phosphoinositide 3-OH kinase/AKT2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology* 2000;20:139-48.
68. Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, Bishop WR, Pai JK. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:14459-64.
69. Rowell CA, Kowalczyk JJ, Lewis MD, Garcia AM. Direct demonstration of geranylgeranylation and farnesylation of Ki-Ras in vivo. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:14093-7.
70. Lerner EC, Zhang TT, Knowles DB, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM. Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyltransferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines. *Oncogene* 1997;15:1283-8.
71. Prendergast GC. Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic mechanism and clinical prospects. *Current opinion in cell biology* 2000;12:166-73.
72. Sebti SM, Hamilton AD. Inhibition of Ras prenylation: a novel approach to cancer chemotherapy. *Pharmacology & therapeutics* 1997;74:103-14.
73. Ashar HR, Armstrong L, James LJ, Carr DM, Gray K, Taveras A, Doll RJ, Bishop WR, Kirschmeier PT. Biological effects and mechanism of action of farnesyl transferase inhibitors. *Chemical research in toxicology* 2000;13:949-52.
74. Hunt JT, Ding CZ, Batorsky R, Bednarz M, Bhide R, Cho Y, Chong S, Chao S, Gullo-Brown J, Guo P, Kim SH, Lee FY, Leftheris K, Miller A, Mitt T, Patel M, Penhallow BA, Ricca C, Rose WC, Schmidt R, Slusarchyk WA, Vite G, Manne V. Discovery of (R)-7-cyano-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(phenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepine (BMS-214662), a farnesyltransferase inhibitor

with potent preclinical antitumor activity. *Journal of medicinal chemistry* 2000;43:3587-95.

75. Manne V, Lee FY, Bol DK, Gullo-Brown J, Fairchild CR, Lombardo LJ, Smykla RA, Vite GD, Wen ML, Yu C, Wong TW, Hunt JT. Apoptotic and cytostatic farnesyltransferase inhibitors have distinct pharmacology and efficacy profiles in tumor models. *Cancer research* 2004;64:3974-80.

76. Rose WC, Lee FY, Fairchild CR, Lynch M, Monticello T, Kramer RA, Manne V. Preclinical antitumor activity of BMS-214662, a highly apoptotic and novel farnesyltransferase inhibitor. *Cancer research* 2001;61:7507-17.

77. Adjei AA, Erlichman C, Davis JN, Cutler DL, Sloan JA, Marks RS, Hanson LJ, Svingen PA, Atherton P, Bishop WR, Kirschmeier P, Kaufmann SH. A Phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: evidence for biological and clinical activity. *Cancer research* 2000;60:1871-7.

78. Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, End DW, Wright JJ, Bol K, Horak I, Tidwell ML, Liesveld J, Kottke TJ, Ange D, Buddharaju L, Gojo I, Highsmith WE, Belly RT, Hohl RJ, Rybak ME, Thibault A, Rosenblatt J. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood* 2001;97:3361-9.

79. Chun KH, Lee HY, Hassan K, Khuri F, Hong WK, Lotan R. Implication of protein kinase B/Akt and Bcl-2/Bcl-XL suppression by the farnesyl transferase inhibitor SCH66336 in apoptosis induction in squamous carcinoma cells. *Cancer research* 2003;63:4796-800.

80. Mizukami Y, Ura H, Obara T, Habiro A, Izawa T, Osanai M, Yanagawa N, Tanno S, Kohgo Y. Requirement of c-jun N-terminal kinase for apoptotic cell death induced by farnesyltransferase inhibitor, farnesylamine, in human pancreatic cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2001;288:198-204.

81. Du W, Liu A, Prendergast GC. Activation of the PI3'K-AKT pathway masks the proapoptotic effects of farnesyltransferase inhibitors. *Cancer research* 1999;59:4208-12.
82. Marzo I, Perez-Galan P, Giraldo P, Lopez-Royuela N, Gomez-Benito M, Larrad L, Lasiera P, Rubio-Felix D, Anel A, Naval J. Farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2004;18:1599-604.
83. Cortes J, Faderl S, Estey E, Kurzrock R, Thomas D, Beran M, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Giles F, Koller C, O'Brien S, Wright J, Bai SA, Kantarjian H. Phase I study of BMS-214662, a farnesyl transferase inhibitor in patients with acute leukemias and high-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:2805-12.
84. Copland M, Pellicano F, Richmond L, Allan EK, Hamilton A, Lee FY, Weinmann R, Holyoake TL. BMS-214662 potently induces apoptosis of chronic myeloid leukemia stem and progenitor cells and synergizes with tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2008;111:2843-53.
85. Pellicano F, Copland M, Jorgensen HG, Mountford J, Leber B, Holyoake TL. BMS-214662 induces mitochondrial apoptosis in chronic myeloid leukemia (CML) stem/progenitor cells, including CD34+38- cells, through activation of protein kinase Cbeta. *Blood* 2009;114:4186-96.
86. Pellicano F, Simara P, Sinclair A, Helgason GV, Copland M, Grant S, Holyoake TL. The MEK inhibitor PD184352 enhances BMS-214662-induced apoptosis in CD34+ CML stem/progenitor cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2011;25:1159-67.
87. Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:136-41.

88. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature reviews Cancer* 2006;6:729-34.
89. Rohde J, Heitman J, Cardenas ME. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:9583-6.
90. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471-84.
91. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2004;4:335-48.
92. Dancey JE. Inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Expert opinion on investigational drugs* 2005;14:313-28.
93. Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *International journal of oncology* 2004;24:893-900.
94. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine* 2002;8:128-35.
95. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and cellular biology* 2002;22:7004-14.
96. Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battegay EJ. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002;16:771-80.

97. Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:20534-43.
98. Mayerhofer M, Valent P, Sperr WR, Griffin JD, Sillaber C. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. *Blood* 2002;100:3767-75.
99. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *The EMBO journal* 1997;16:3693-704.
100. Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:4441-5.
101. Meyuhas O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European journal of biochemistry / FEBS* 2000;267:6321-30.
102. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & development* 2001;15:2852-64.
103. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & development* 2001;15:807-26.
104. Mothe-Satney I, Brunn GJ, McMahon LP, Capaldo CT, Abraham RT, Lawrence JC, Jr. Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-I in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:33836-43.

105. Hahghat A, Sonenberg N. eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:21677-80.
106. Hinton TM, Coldwell MJ, Carpenter GA, Morley SJ, Pain VM. Functional analysis of individual binding activities of the scaffold protein eIF4G. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:1695-708.
107. Raught B, Gingras AC, Gygi SP, Imataka H, Morino S, Gradi A, Aebersold R, Sonenberg N. Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *The EMBO journal* 2000;19:434-44.
108. Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivieres S, Mercep L, Ferrari S. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:14424-9.
109. West MJ, Stoneley M, Willis AE. Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signalling pathway. *Oncogene* 1998;17:769-80.
110. Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, Zilbermann F, Ruetz S, O'Reilly T, Natt F, Hall J, Lane HA, Thomas G. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell* 2005;120:747-59.
111. Boulay A, Rudloff J, Ye J, Zumstein-Mecker S, O'Reilly T, Evans DB, Chen S, Lane HA. Dual inhibition of mTOR and estrogen receptor signaling in vitro induces cell death in models of breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:5319-28.
112. Boulay A, Zumstein-Mecker S, Stephan C, Beuvink I, Zilbermann F, Haller R, Tobler S, Heusser C, O'Reilly T, Stolz B, Marti A, Thomas G, Lane HA. Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer research* 2004;64:252-61.

113. Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, Manola J, Brugarolas J, McDonnell TJ, Golub TR, Loda M, Lane HA, Sellers WR. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nature medicine* 2004;10:594-601.
114. Torres-Arzayus MI, Font de Mora J, Yuan J, Vazquez F, Bronson R, Rue M, Sellers WR, Brown M. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer cell* 2004;6:263-74.
115. Budde K, Neumayer HH, Lehne G, Winkler M, Hauser IA, Lison A, Fritsche L, Souillou JP, Fauchald P, Dantal J. Tolerability and steady-state pharmacokinetics of everolimus in maintenance renal transplant patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2004;19:2606-14.
116. Kovarik JM, Kaplan B, Silva HT, Kahan BD, Dantal J, McMahon L, Berthier S, Hsu CH, Rordorf C. Pharmacokinetics of an everolimus-cyclosporine immunosuppressive regimen over the first 6 months after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2003;3:606-13.
117. Hidalgo M, Buckner JC, Erlichman C, Pollack MS, Boni JP, Dukart G, Marshall B, Speicher L, Moore L, Rowinsky EK. A phase I and pharmacokinetic study of temsirolimus (CCI-779) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:5755-63.
118. Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Vera K, Materman E, Boni J, Leister C, Korth-Bradley J, Hanauske A, Armand JP. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004;22:2336-47.

119. Peralba JM, DeGraffenried L, Friedrichs W, Fulcher L, Grunwald V, Weiss G, Hidalgo M. Pharmacodynamic Evaluation of CCI-779, an Inhibitor of mTOR, in Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003;9:2887-92.
120. O'Donnell A, Faivre S, Burris HA, 3rd, Rea D, Papadimitrakopoulou V, Shand N, Lane HA, Hazell K, Zoellner U, Kovarik JM, Brock C, Jones S, Raymond E, Judson I. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:1588-95.
121. Tanaka C, O'Reilly T, Kovarik JM, Shand N, Hazell K, Judson I, Raymond E, Zumstein-Mecker S, Stephan C, Boulay A, Hattenberger M, Thomas G, Lane HA. Identifying optimal biologic doses of everolimus (RAD001) in patients with cancer based on the modeling of preclinical and clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:1596-602.
122. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research* 2006;66:1500-8.
123. Vilar E, Perez-Garcia J, Tabernero J. Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* 2011;10:395-403.
124. Atzori F, Tabernero J, Cervantes A, Prudkin L, Andreu J, Rodriguez-Braun E, Domingo A, Guijarro J, Gamez C, Rodon J, Di Cosimo S, Brown H, Clark J, Hardwick JS, Beckman RA, Hanley WD, Hsu K, Calvo E, Rosello S, Langdon RB, Baselga J. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of dalotuzumab (MK-0646), an anti-insulin-like growth factor-1 receptor monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:6304-12.

125. Di Cosimo S, Bendell JC, Cervantes-Ruiperez A, Roda D, Prudkin L, Stein MN, Leighton-Swayze A, Song Y, Ebbinghaus S, Baselga J. A phase I study of the oral mTOR inhibitor ridaforolimus (RIDA) in combination with the IGF-1R antibody dalotuzumab (DALO) in patients (pts) with advanced solid tumors. *Journal Of Clinical Oncology* 2010;28:15s (suppl; Abstract 3008).
126. Ellard SL, Clemons M, Gelmon KA, Norris B, Kennecke H, Chia S, Pritchard K, Eisen A, Vandenberg T, Taylor M, Sauerbrei E, Mishaeli M, Huntsman D, Walsh W, Olivo M, McIntosh L, Seymour L. Randomized phase II study comparing two schedules of everolimus in patients with recurrent/metastatic breast cancer: NCIC Clinical Trials Group IND.163. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:4536-41.
127. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grunwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008;372:449-56.
128. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Oberg K. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *The New England journal of medicine* 2011;364:514-23.
129. Krueger DA, Care MM, Holland K, Agricola K, Tudor C, Mangeshkar P, Wilson KA, Byars A, Sahmoud T, Franz DN. Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. *The New England journal of medicine* 2010;363:1801-11.
130. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, Yardley D, Deleu I, Perez A, Bachelot T, Vittori L, Xu Z, Mukhopadhyay P, Lebwohl D, Hortobagyi GN. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* 2012;366:520-9.

131. Di Nicolantonio F, Arena S, Tabernero J, Grosso S, Molinari F, Macarulla T, Russo M, Cancelliere C, Zecchin D, Mazzucchelli L, Sasazuki T, Shirasawa S, Geuna M, Frattini M, Baselga J, Gallicchio M, Biffo S, Bardelli A. Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. *The Journal of clinical investigation* 2010;120:2858-66.

APENDICE: OTRAS PUBLICACIONES

1. Baselga J, Cervantes A, Martinelli E, Chirivella I, Hoekman K, Hurwitz HI, Jodrell DI, Hamberg P, Casado E, Elvin P, Swaisland A, Iacona R, Tabernero J. Phase I safety, pharmacokinetics, and inhibition of SRC activity study of saracatinib in patients with solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:4876-83.
2. Macarulla T, Cervantes A, Elez E, Rodriguez-Braun E, Baselga J, Rosello S, Sala G, Blasco I, Danaee H, Lee Y, Ecsedy J, Shinde V, Chakravarty A, Bowman D, Liu H, Eton O, Fingert H, Tabernero J. Phase I study of the selective Aurora A kinase inhibitor MLN8054 in patients with advanced solid tumors: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Molecular cancer therapeutics* 2010;9:2844-52.
3. Tabernero J, Cervantes A, Rivera F, Martinelli E, Rojo F, von Heydebreck A, Macarulla T, Rodriguez-Braun E, Eugenia Vega-Villegas M, Senger S, Ramos FJ, Rosello S, Celik I, Stroh C, Baselga J, Ciardiello F. Pharmacogenomic and pharmacoproteomic studies of cetuximab in metastatic colorectal cancer: biomarker analysis of a phase I dose-escalation study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28:1181-9.
4. Tabernero J, Ciardiello F, Rivera F, Rodriguez-Braun E, Ramos FJ, Martinelli E, Vega-Villegas ME, Rosello S, Liebscher S, Kisker O, Macarulla T, Baselga J, Cervantes A. Cetuximab administered once every second week to patients with metastatic colorectal cancer: a two-part pharmacokinetic/pharmacodynamic phase I dose-escalation study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2010;21:1537-45.
5. Atzori F, Tabernero J, Cervantes A, Prudkin L, Andreu J, Rodriguez-Braun E, Domingo A, Guijarro J, Gamez C, Rodon J, Di Cosimo S, Brown H, Clark J, Hardwick JS, Beckman RA, Hanley WD, Hsu K, Calvo E, Rosello S, Langdon RB, Baselga J. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of dalotuzumab (MK-0646), an anti-insulin-like growth factor-1 receptor monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:6304-12.

6. Paz-Ares LG, Gomez-Roca C, Delord JP, Cervantes A, Markman B, Corral J, Soria JC, Berge Y, Roda D, Russell-Yarde F, Hollingsworth S, Baselga J, Umana P, Manenti L, Tabernero J. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic dose-escalation study of RG7160 (GA201), the first glycoengineered monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:3783-90.

7. Tabernero J, Dirix L, Schoffski P, Cervantes A, Lopez-Martin JA, Capdevila J, van Beijsterveldt L, Platero S, Hall B, Yuan Z, Knoblauch R, Zhuang SH. A phase I first-in-human pharmacokinetic and pharmacodynamic study of serdemetan in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:6313-21.

8. Cervantes A, Elez E, Roda D, Ecsedy J, Macarulla T, Venkatakrishnan K, Rosello S, Andreu J, Jung J, Sanchis-Garcia JM, Piera A, Blasco I, Manos L, Perez-Fidalgo JA, Fingert H, Baselga J, Tabernero J. Phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic study of MLN8237, an investigational, oral, selective aurora a kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18:4764-74.