

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 908 078**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 20159381 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022 EP 3693741**

(54) Título: **Usos médicos que implican mutantes C-RAF que confieren resistencia a los inhibidores de RAF**

(30) Prioridad:

**28.03.2012 US 201261616999 P
01.10.2012 US 201261708372 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2022

(73) Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US**

(72) Inventor/es:

**EMERY, CAROLINE;
ANTONY, RAJEEE y
GARRAWAY, LEVI A.**

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 908 078 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Usos médicos que implican mutantes C-RAF que confieren resistencia a los inhibidores de RAF

5 Investigación o desarrollo patrocinado a nivel federal La presente invención se realizó con soporte del gobierno con la subvención federal n.º DP2 OD002750, otorgada por National Institutes of Health. El Gobierno tiene determinados derechos sobre la presente invención.

Antecedentes

10 En del 50 al 70 % de los melanomas malignos, se encuentran mutaciones oncogénicas en la serina/treonina quinasa B-RAF (también conocida como BRAF). (Davies, H. *et al.*, *Nature* 417, 949-954 (2002).) El melanoma se considera la forma más letal de cáncer de piel y, para el año 2012, el National Cancer Institute estimó 72.250 casos nuevos que podrían conducir a la muerte de aproximadamente 9.180 personas en Estados Unidos. Los estudios preclínicos han demostrado que la mutación B-RAF(V600E) predice una dependencia de la cascada de señalización de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) en el melanoma (Hoeflich, K. P. *et al.*, *Cancer Res.* 69, 3042-3051 (2009); McDermott, U. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.* 104, 19936-19941 (2007); Solit, D. B. *et al.* "BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition". *Nature* 439, 358-362 (2006); Wan, P. T. *et al.*, *Cell* 116, 855-867 (2004); Wellbrock, C. *et al.*, *Cancer Res.* 64, 2338-2342 (2004)) - una observación que se ha validado gracias al éxito de inhibidores de RAF o de MEK en ensayos clínicos (Flaherty, K. T. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 363, 809-819 (2010); Infante, J. R. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 28 (supl.), 2503 (2010); Schwartz, G. K. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 27 (supl.), 3513 (2009).)

25 Recientemente, la FDA aprobó el inhibidor de Raf Vemurafenib (PLX4032). (Dummer *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2010; Joseph *et al.*, 2010; Flaherty *et al.*, 2010). Sin embargo, las respuestas clínicas a los agentes terapéuticos dirigidos contra el cáncer a menudo se confunden con la resistencia *de novo* o la resistencia adquirida. (Engelman, J. A. *et al.*, *Science* 316, 1039-1043 (2007); Gorre, M. E. *et al.*, *Science* 293, 876-880 (2001); Heinrich, M. C. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 24, 4764-4774 (2006); Daub, H., Specht, K. y Ullrich, A. *Nature Rev. Drug Discov.* 3, 1001-1010 (2004).) En el entorno clínico e *in vitro*, recientemente, se ha demostrado que este fenómeno se rige por la sobreexpresión de un módulo de señalización paralelo (CRAF, COT) (Montagut *et al.*, *Cancer Res* 68:4853-4861 (2008); Johannessen *et al.*, *Nature* 468:968-972 (2010)), la activación de una vía de señalización paralela (PDGFRb, IGF-1R) (Nazarian *et al.*, *Nature* 468: 973-977 (2010); Villanueva *et al.*, *Cancer Cell* 18: 683-695 (2010)), la amplificación de una diana cadena arriba (BRAF) (Shi *et al.*, *Nat Commun* 3:724 (2012)), la eliminación en la diana (p61BRAF) (Poulikakos *et al.*, *Nature* 480:387-390 (2011)) o mediante la activación de mutaciones en la diana cadena abajo o en la propia proteína diana (Mek) (Emery *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 106: 20411-20416 (2009); Wagle *et al.*, *JCO* 29: 3085-3096 (2011). Montagut *et al.*, (2008), *Cancer Research*, 68(12):4853-4861 se refiere a la elevación de CRAF como un posible mecanismo de la resistencia adquirida a la inhibición de BRAF en la melanoma. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de nuevos métodos para identificar mecanismos de resistencia de forma que se diluciden dianas "susceptibles de convertirse en fármacos" para estrategias de tratamiento eficaces a largo plazo, de nuevos métodos para identificar pacientes que puedan beneficiarse de las estrategias de tratamiento y de métodos para tratar a los pacientes con las estrategias de tratamiento eficaces a largo plazo.

Breve sumario

45 La presente invención se refiere al desarrollo de resistencia a agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer y a la identificación de dianas que confieren resistencia al tratamiento del cáncer. La presente invención también se refiere a la identificación de dianas farmacológicas paralelas para facilitar una estrategia de tratamiento eficaz a largo plazo y a la identificación de pacientes que se beneficiarán de dicho tratamiento.

50 En un aspecto, la presente invención proporciona un inhibidor de B-RAF para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, en el que al menos una parte de una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido C-RAF extraído de células de un cáncer del sujeto se ha determinado que comprende una o más mutaciones que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido C-RAF codificado en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre que comprende SEQ ID NO: 2 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 104E>K, 257S>P, 261P>T, 356G>E, 361G>A, 427S>T, 447D>N, 469M>I, 478E>K y 554R>K en comparación con SEQ ID NO: 2; y en el que el inhibidor de RAF se administra con un segundo inhibidor; en el que el fin del segundo inhibidor es ajustar el tratamiento en respuesta a la identificación de las mutaciones mencionadas anteriormente que indican una probable resistencia al inhibidor de B-RAF.

60 Aspectos adicionales de la divulgación

65 En el presente documento, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido C-RAF mutante que tiene actividad C-RAF. El polipéptido C-RAF mutante incluye al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre que comprende SEQ ID NO: 2, confiriendo la al menos

una sustitución de aminoácido resistencia a uno o más inhibidores de RAF en una célula que expresa el polipéptido RAF mutante.

En el presente documento, se describe un vector de expresión. El vector de expresión incluye la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido C-RAF mutante que tiene actividad C-RAF, en el que el polipéptido C-RAF mutante incluye al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre que comprende SEQ ID NO: 2 y la al menos una sustitución de aminoácido confiere resistencia a uno o más inhibidores de RAF en una célula que expresa el polipéptido RAF mutante.

10 En el presente documento, se describe una célula hospedadora. La célula hospedadora incluye el vector de expresión.

15 En el presente documento, se describe un polipéptido C-RAF mutante aislado que tiene actividad C-RAF. El polipéptido C-RAF mutante incluye al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre que comprende SEQ ID NO: 2 y la al menos una sustitución de aminoácido confiere resistencia a uno o más inhibidores de RAF en una célula que expresa el polipéptido C-RAF mutante.

20 En el presente documento, se describe un preparado de anticuerpos. El preparado de anticuerpos se une específicamente a un polipéptido C-RAF mutante aislado de la presente invención.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra alelos mutantes C-RAF en células A375 (BRAFV600E) resistentes al inhibidor de RAF PLX4720.

25 (A) Se muestra la puntuación media de las variantes de las mutaciones candidatas a través de la secuencia de codificación de C-RAF de la selección por mutagénesis de PLX4720. Se indican las sustituciones de aminoácidos correspondientes de las mutaciones de puntuación alta (>2 %). (B) Izquierda: se muestra la estructura cristalina del dominio quinasa de C-RAF (restos 340-618; gris) (código PDB: 3OMV), que incluye mutantes de resistencia C-RAF representativos (barras) junto con un modelo de relleno de espacios de PLX4720 unido. También se indican el motivo DFG y el bucle P. Derecha: estructura de C-RAF girada 90 ° para exponer el resto R401 de la superficie de contacto del dímero (las estructuras se renderizan con PyMOL). (C) La estructura de dominio C-RAF que representa (CR, región conservada; RBD, dominio de unión a Ras; y CRD, dominio rico en cisteína) muestra la ubicación de mutantes de resistencia C-RAF (asteriscos) y de tres restos de serina importantes para la regulación de C-RAF (círculos).

30 La Figura 2 ilustra la caracterización funcional de mutantes de resistencia C-RAF.

40 (A) Se trataron células A375 que expresaban C-RAF (WT) y C-RAF (alelos identificados) con inhibidor de RAF PLX4720 de una manera dependiente de la dosis (0,08 µM, 0,4 µM, 2 µM, 5 µM y 10 µM) durante 90 min. Inmunotransferencia que muestra pErk1/2, pMek1/2, C-RAF. Se usó α-tubulina como control de carga. (B) Se trataron células A375 que expresaban mutantes C-RAF altamente resistentes con 2 µM de PLX4720 durante 16 h. Se muestran los niveles de pMek1/2, pErk1/2, Mek, S259 C-RAF, S338 C-RAF, S621 C-RAF y actina. (C) Curvas de inhibición del crecimiento de A375 y los alelos de resistencia C-RAF en respuesta a PLX4720 y (D) vemurafenib. (E) Se trataron células A375 que expresaban mutantes de C-RAF altamente resistentes con 1 µM de inhibidor de MEK AZD6244 durante 16 h. Se muestran los niveles de pMek1/2, pErk1/2, Mek, S259 C-RAF, S338 C-RAF, S621 C-RAF y actina. (F) Curvas de inhibición del crecimiento de A375 y los alelos de resistencia C-RAF en respuesta a AZD6244 y (G) Mek-GSK 1120212.

45 50 La Figura 3 ilustra que los mutantes de resistencia C-RAF muestran un aumento de la asociación con B-RAF.

55 Se inmunoprecipitaron con C-RAF total (A) células 293/T que expresaban alelos de resistencia C-RAF y (B) células A375 que expresaban alelos de resistencia C-RAF. Los niveles de proteína unida (B-RAF y 14-3-3) se evaluaron mediante inmunotransferencia. El lisado de entrada (paneles inferiores) muestra 14-3-3, B-RAF, C-RAF, pMek1/2, pErk1/2, Mek, actina y S259 C-RAF, S338 C-RAF y S621 C-RAF (paneles derechos superiores). Los resultados son representativos de más de dos experimentos independientes.

60 La Figura 4 ilustra la caracterización bioquímica de los alelos de resistencia C-RAF usando (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1H-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato.

65 (A) La inmunotransferencia representa pMek1/2, pErk1/2, Mek, Erk y C-RAF en células A375 que expresan alelos de resistencia C-RAF en respuesta al tratamiento durante 16 h con 1 µM de PLX4720, (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1H-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato y AZD6244. Se usó actina como control de carga. (B) Curvas de inhibición del crecimiento de A375 y los alelos de resistencia C-RAF en respuesta a PLX4720. (C) (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1H-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato y (D) AZD6244.

La Figura 5 ilustra que los mutantes de resistencia C-RAF confieren resistencia a Vemurafenib (PLX4032).

(A) Curvas de inhibición del crecimiento de A375 y los alelos de resistencia C-RAF en respuesta a Vemurafenib (PLX4032). (B) actividad de C-RAF quinasa en extractos de células A375 que expresan WT, S257P, P261T y G361A en presencia y ausencia de Vemurafenib durante 16 h. La inmunotransferencia representa pMek1/2, pErk1/2, Mek, Erk y actina. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. (C) Curvas de inhibición del crecimiento de A375 y los alelos de resistencia C-RAF en respuesta a PLX4720, (D) AZD6244 y (E) PLX4720 y AZD6244.

La Figura 6 ilustra la homodimerización y la actividad quinasa de mutantes de resistencia C-RAF.

(A) Se inmunoprecipitaron células 293T que expresaban conjuntamente mutantes de resistencia C-RAF marcados con His/V5 y marcados con Flag durante 48 h con níquel (véanse los Métodos) para desplegar C-RAF marcado con His, y se evaluó el C-RAF marcado con Flag mediante inmunotransferencia. También se evaluó el lisado de entrada usando anticuerpos que detectaban Flag-C-RAF, V5-C-RAF, C-RAF total, p-MEK, p-ERK y ERK total. (B) Se trataron células 293T que expresaban conjuntamente mutantes de resistencia C-RAF marcados con His/V5 y marcados con Flag bien con vehículo (DMSO) o con 2 µM de vemurafenib durante 1 hora, y se inmunoprecipitó C-RAF marcada con His/V5 como en (A) anterior. Los lisados de entrada se inmunotransfirieron usando anticuerpos que reconocían C-RAF (S338), p-MEK, p-ERK y actina (control de carga). (C) Se midió la actividad de C-Raf quinasa *in vitro* en extractos celulares derivados de células 293T que expresaban transitoriamente el vector vacío marcado con Flag ("C"), C-RAF de tipo salvaje ("WT") y C-RAF que albergaba mutantes de resistencia S257P, P261T, G361A y E478K. Los ensayos se realizaron en presencia o ausencia de 2 µM de vemurafenib (véanse los Métodos). También se inmunotransfirió el lisado de entrada usando anticuerpos que detectaban p-MEK1/2, p-ERK1/2, MEK total, ERK total y actina. (D) Se midió la actividad de C-Raf quinasa *in vitro* en extractos celulares derivados de células A375 (B-RAF^{V600E}) ("C") y A375 que expresan establemente C-RAF de tipo silvestre ("WT"), y C-RAF que alberga los mutantes de resistencia S257P, P261T y G361A en presencia y ausencia de 2 µM de vemurafenib. Se realizaron estudios de inmunotransferencia en el lisado de entrada usando anticuerpos que reconocían a p-MEK1/2, p-ERK1/2, MEK total, ERK total y actina. Todos los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

La Figura 7 ilustra la homodimerización y las propiedades de unión a 14-3-3 ζ de mutantes de resistencia C-RAF.

(A) Se inmunoprecipitaron células 293/T que expresaban transitoriamente los mutantes de resistencia C-RAF indicados en ausencia (-) o presencia (+) de 2 µM de vemurafenib durante 1 h con C-RAF, y se evaluaron los niveles de proteína unida (B-RAF y 14-3-3 ζ) (paneles superiores) mediante inmunotransferencia. El lisado de entrada (paneles inferiores) muestra 14-3-3 ζ, B-RAF, C-RAF, pMek1/2, pErk1/2, Mek, S338 C-RAF y actina. Los resultados son representativos de más de dos experimentos independientes. (B) Se inmunoprecipitaron células A375 que expresaban establemente los mutantes de resistencia C-RAF indicados en presencia y en ausencia de 2 µM de vemurafenib durante 16 h con C-RAF, y se evaluaron los niveles de proteína unida (B-RAF y 14-3-3 ζ) (paneles superiores) mediante inmunotransferencia. El lisado de entrada se transfirió para lo mismo que en la Fig. 7A. Los resultados son representativos de más de dos experimentos independientes.

La Figura 8 ilustra que los mutantes de resistencia C-RAF requieren dimerización para la señalización de MEK/ERK.

(A) Se expresaron construcciones que expresaban C-RAF marcado con Flag, de tipo silvestre o los mutantes de resistencia C-RAF indicados en ausencia (izquierda) o en presencia (derecha) del mutante R401H deficiente en dimerización (rosa) en células 293T. Se transfirieron los lisados usando anticuerpos que reconocían a p-MEK, p-ERK, MEK total o C-RAF total. (B) Se cultivaron células 293/T que expresaban conjuntamente mutantes de resistencia C-Raf marcados con His por sí mismas y en el contexto de la deficiencia de la dimerización (rosa) en ausencia o en presencia de vemurafenib (2 µM, 1 hora). Se realizaron inmunoprecipitaciones usando perlas de níquel y se evaluaron los niveles de C-RAF marcado con Flag mediante inmunotransferencia. También se muestran los lisados de entrada transferidos con anticuerpos que reconocen Flag-C-RAF, V5-C-RAF, C-RAF total, p-MEK, p-ERK, S338-C-RAF y actina.

La Figura 9 ilustra la caracterización bioquímica de alelos de resistencia C-RAF.

(A) La comparación de los niveles de pMek/pErk usando células A375 que expresaban C-RAF que contenía diversos alelos de resistencia que emergieron de las exploraciones por mutagénesis aleatoria se expresó en células A375. Se incluyó tubulina como control positivo. (B) Se trataron células A375 que expresaban C-RAF de tipo silvestre o alelos de resistencia C-RAF con el inhibidor de Raf PLX4720 durante 90 minutos a las dosis indicadas. Se realizaron estudios de inmunotransferencia con anticuerpos contra p-ERK, p-MEK y C-RAF total. Se usó tubulina como control de carga.

La Figura 10 ilustra la homodimerización y la actividad quinasa.

5 (A) Se inmunoprecipitaron células 293/T que expresaban conjuntamente mutantes de resistencia C-RAF marcados con His/V5 con C-RAF WT marcado con Flag tras 48 h con His, y se evaluaron los niveles de interacción de C-RAF marcado con Flag mediante inmunotransferencia. El lisado de entrada representa Flag-C-RAF, V5-C-RAF, C-RAF, pMek, pErk y Erk. (B) Se transfectaron células 293/T con el mutante C-RAF deficiente en dimerización R401H y el mutante guardián T421N, y se detectó la sensibilidad hacia Mek/Erk en presencia de vemurafenib (2 μ M) durante 1 h. T421N se usó como control negativo y G361A se usó como control positivo.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

15 La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, inmunología, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de las habilidades en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, (Edición actual); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel *et al.* eds., (Edición actual)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (Edición actual); ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)). "DNA Cloning: A Practical Approach", vol. I y II (D. Glover, ed.); "Oligonucleotide Synthesis" (N. Gait, ed., Edición actual); "Nucleic Acid Hybridization" (B. Hames y S. Higgins, eds., Edición actual); "Transcription and Translation" (B. Hames y S. Higgins, eds., Edición actual); "Fundamental Virology", 2.^a edición, vol. I y II (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds.)

20 La cascada de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) es una vía de señalización intracelular fundamental que regula la transducción de señales en respuesta a diversos estímulos extracelulares, entre los que se incluyen los factores de crecimiento, citocinas y protooncogenes. La activación de esta vía produce la activación del factor de transcripción y alteraciones en la expresión génica, que finalmente conducen a cambios en las funciones celulares, incluyendo la proliferación celular, la regulación del ciclo celular, la supervivencia celular, la angiogénesis y la migración celular. La señalización clásica de MAPK es iniciada por receptores tirosina quinasa en la superficie celular, sin embargo, otras muchas moléculas de la superficie celular son capaces de activar la cascada de MAPK, incluyendo las integrinas, Las proteínas G heterotriméricas y los receptores de citocinas.

25 30 La unión del ligando a un receptor de la superficie celular, por ejemplo, un receptor tirosina quinasa, normalmente produce la fosforilación del receptor. La proteína adaptadora Grb2 se asocia con el dominio intracelular fosforilado del receptor activado, y esta asociación recluta factores de intercambio de nucleótidos de guanina que incluyen SOS-I y CDC25 hacia la membrana celular. Estos factores de intercambio de nucleótidos de guanina interactúan y activan la GTPasa Ras. Las isoformas comunes de Ras incluyen K-Ras, N-Ras, H-Ras y otras. Tras la activación de Ras, la serina/treonina quinasa Raf (por ejemplo, A-Raf, B-Raf, C-Raf o Raf-1) se recluta hacia la membrana celular mediante la interacción con Ras o de manera independiente de Ras en el citosol, en el que experimenta cambios de configuración y se une a proteínas de armazón tales como 14-3-3 (King *et al.*, *Nature* 396; 180-183 (1998); Chaudhary *et al.*, *Curr Biol* 10: 551-554 (2000); Avruch *et al.*, *Endo Rev* 56: 127-156 (2001), Wellbrock *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 875-885 (2004). La unión a 14-3-3 y la estabilización/activación de CRAF se rigen por la fosforilación de restos de activación tales como S338, Y341 en la región reguladora de carga negativa (región N) y S621 en el extremo C, fuera del dominio quinasa, y la desfosforilación de restos reguladores negativos tales como S259 en el dominio CR2 (Fig. 1C) y muchos otros sitios de fosforilación distribuidos a lo largo de la proteína que reflejan además su regulación compleja (Avruch *et al.*, *Id.* (2001); Wellbrock *et al.*, *Id.* (2004); Garnett *et al.*, *Mol. Cell* 20: 963-969 (2005). La activación de CRAF también se induce mediante la formación artificial de homodímeros (Avruch *et al.*, *Id.* (2001); Wellbrock *et al.*, *Id.*, (2004).)

40 45 50 Luego se fosforila Raf. Raf activa directamente MEKI y MEK2 mediante la fosforilación de dos restos de serina en las posiciones 217 y 221. Tras la activación, MEKI y MEK2 fosforilan restos de tirosina (Tyr-185) y treonina (Thr-183) en serina/treonina quinases Erk1 y Erk2, lo que resulta en la activación de Erk. La Erk activada regula muchas dianas en el citosol y también se transloca hacia el núcleo, en el que fosforila una serie de factores de transcripción que regulan la expresión génica. La Erk quinasa tiene numerosas dianas, entre las que se incluyen Elk-1, c-Ets1, c-Ets2, p90RSK1, MNK1, MNK2, MSK1, MSK2 y TOB. Si bien la vía anterior es una representación clásica de la señalización de MAPK, existe una interacción considerable entre la vía de MAPK y otras cascadas de señalización.

55 60 65 Las aberraciones en la señalización de MAPK tienen un papel significativo en la biología del cáncer. La expresión alterada de Ras es común en muchos cánceres, y también se han identificado mutaciones activadoras en Ras. Dichas mutaciones se encuentran en hasta el 30 % de todos los cánceres, y son especialmente comunes en los carcinomas pancreáticos (90 %) y de colon (50 %). Además, se han identificado mutaciones activadoras de B-Raf en los melanomas y en el cáncer de ovario. La mutación más habitual, BRAF^{V600E}, produce la activación constitutiva de la vía de MAP quinasa cadena abajo, y es necesaria para la proliferación de las células de melanoma, el crecimiento de agar blando y la formación de xenoinjertos tumorales. La amplificación de CRAF es ha visto implicada en el cáncer de próstata y el cáncer de vejiga (Edwards *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2001), además de translocaciones cromosómicas en el cáncer de estómago y los astrocitomas pilocíticos (Shimizu *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 2009). Sin

embargo, la tasa de aparición de mutaciones CRAF en los cánceres humanos es del 1 % (COSMIC), lo que es atribuible a su baja actividad quinasa basal en comparación con BRAF (Marais *et al.*, *Science* 280: 109-112 (1997); Emuss *et al.*, *Cancer Res* 65: 9719-9726 (2005); Garnett *et al.*, *Mol. Cell* 20: 963-969 (2005)). Basándose en la función definida de la sobreactivación de MAPK en los cánceres humanos, los componentes de dirección de la vía

5 de MAPK con inhibidores específicos son un enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, los pacientes pueden tener resistencia innata o resistencia adquirida a estos tratamientos prometedores. A continuación, se describen la identificación de mutaciones que confieren resistencia en quinasas diana, marcadores de diagnóstico y/o de pronóstico y terapias de tratamiento para estos pacientes con resistencia innata o adquirida.

10 MUTACIONES C-RAF

Aunque el tratamiento del cáncer con inhibidores de RAF, tales como PLX4032, es un enfoque terapéutico prometedor, con frecuencia, los pacientes que reciben dichos tratamientos recaen o no responden, y por consiguiente, la enfermedad de estos pacientes progresiona. Como se describe en el presente documento, la presente invención se refiere al descubrimiento de mutaciones en C-RAF que confieren resistencia a inhibidores de RAF, algunos de los cuales se encuentran actualmente en desarrollo clínico. La adquisición de dicha mutación en las células cancerosas hace que las células del paciente sean resistentes al tratamiento con ciertos inhibidores de RAF. La invención se refiere al desarrollo de resistencia a los inhibidores de RAF que pueden incluir, pero sin limitación, RAF265, sorafenib, SB590885, PLX 4720, PLX4032, GDC-0879, ZM 336372 y (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1H-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato. En la Tabla 1 se muestran inhibidores de RAF ilustrativos. El inhibidor de RAF (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1H-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato se aborda genérica y específicamente (Compuesto 9, tabla 1, página 50 del documento provisional; Compuesto 9 de la pág. 72 de la publicación PCT WO2011/025927).

25 La emergencia clínica de una mutación de C-RAF que confiera resistencia a un inhibidor de RAF como se describe en el presente documento sugiere que la relevancia biológica de la dependencia asociada a RAF/MEK se mantiene incluso en etapas avanzadas de malignidad. Así pues, la insuficiencia de inhibidores de RAF para generar respuestas tumorales duraderas en muchos tumores malignos, incluyendo los melanomas, puede indicar una 30 potencia o farmacodinámica subóptimas del fármaco en el entorno clínico. Basándose en los hallazgos descritos en el presente documento, las modalidades de tratamiento que implican agentes dirigidos en tumores dirigidos por RAF o MEK pueden beneficiarse de fármacos más potentes, la dosificación modificada de fármacos existentes o la inhibición combinada de RAF y MEK. Los ejemplos de inhibidores de RAF incluyen, pero sin limitación, los inhibidores enumerados en la Tabla I. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de MEK incluyen AZD6244; CI-1040; 35 PD184352; PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119, 6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-4-(4-fenoxy-fenilamino)-quinolin-3-carbonitrilo y 4-[3-cloro-4-(1-metil-1H-imidazol-2-ilsulfanil)-fenilamino]-6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinolin-3-carbonitrilo. En la Tabla 2, se muestran inhibidores de MEK a modo de ejemplo. Estas innovaciones terapéuticas, junto con un sólido perfil genómico tumoral para estratificar a los pacientes, deberían acelerar el 40 advenimiento del tratamiento personalizado contra el cáncer en los cánceres con mutaciones oncogénicas "susceptibles de convertirse en fármacos".

Tabla 1: Inhibidores de RAF ilustrativos

	Nombre	N.º CAS	Estructura
1	RAF265	92788 0-90-	
2	Sorafenib Tosylate Nexavar Bay 43-9006	47520 7-59-1	

	Nombre	N.º CAS	Estructura
	Sorafenib 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridin-2-carboxamida	28446 1-73-0	
3	SB590885		
4	PLX4720	91850 5-84-7	
5	PLX4032	10298 72-54-5	
6	GDC-0879	90528 1-76-7	
7	ZM 336372	20826 0-29-1	

	Nombre	N.º CAS	Estructura
8	(S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-ilcarbamato		

Tabla 2: Inhibidores de MEK ilustrativos

	Nombre	N.º CAS	Estructura
1	CI-1040/PD184352	212631-79-3	
2	AZD6244	606143-52-6	
3	PD318088	391210-00-7	
4	PD98059	167869-21-8	

5	PD334581		
6	RDEA119 <i>N</i> -[3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-6-metoxifenil]-1-[(2 <i>R</i>)-2,3-dihidroxipropil]-ciclopropanosulfonamida	923032-38-6	
7	6-Metoxy-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-4-(4-fenoxi-fenilamino)-quinolin-3-carbonitrilo		
8	4-[3-Cloro-4-(1-metil-1 <i>H</i> -imidazol-2-iilsulfanil)-fenilamino]-6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinolin-3-carbonitrilo		

En el presente documento, se describen métodos para identificar mutaciones en un polipéptido C-RAF, o mutaciones en una molécula de ácido nucleico que codifique el polipéptido C-RAF, que confieren resistencia a células que expresan el polipéptido C-RAF frente a fármacos que inhiben la actividad de RAF. Un "polipéptido C-RAF mutante",

5 como se hace referencia en el presente documento, incluye un polipéptido C-RAF que incluye una o más mutaciones que confieren resistencia a uno o más inhibidores de RAF conocidos. Asimismo, una "molécula de ácido nucleico de C-RAF mutante", como se hace referencia en el presente documento, incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido C-RAF mutante. Las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos C-RAF que incluyen una o más mutaciones pueden crearse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluyen, por ejemplo, mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida de una secuencia de ácido nucleico de C-RAF de tipo silvestre, que se puede realizar en *E. coli*. En realizaciones a modo de ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de C-RAF de tipo silvestre es una secuencia de ácido nucleico de MEK1 de tipo silvestre humana. En realizaciones específicas, la secuencia de ácido nucleico C-RAF de tipo silvestre es C-RAF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) (número de registro BC018119.2)

(tcggggcgcttggccgcacatcttagatggcgggagaagaggaaaacgattgtgaggcggaaacgg
 cttctgccttttggccccgaaaagggtcagctggccggcttggggcgctgcgcgcgg
 5 agcgcgttgcacgtgcggggctcgctgggctccgtccctgggtggggacgcgcgaatgtgac
 cgccctccgcctccctacccgcgcggggaggaggagcggcgagaagctgcgcgaacgacagg
 acgttggggcgccctgcctcagggttaagaattgtttaagctgcataatggagcacatcacaggagc
 ttggaaagacgatcagaatgggttggatcaaagatgcgtttgtatggcctcagctgcacatctctacaat
 agttcagcagtttgcatacgccggcatcagatgcggaaactcacagatcataagacaagca
 10 acactatccgtttctgcccacaagaaacagtgtcaatgtcgaaatggaatgagctgcacat
 actgccttatgaaagactcaagggtggggcctgcacaccagagtgtcgtcagttcagacttccac
 aacacaaaaggtaaaaaagcacgcttagtggaaatactgtgcgtcttgatggagaagaactcaa
 gtagatttcctggtatgttccctcacaacacacaactttgcggaaagacgttccctgaagctgcctctgt
 15 gacatgtcagaaaattcctgcataatggatttgcatacgacttgtggctacaaatttcatgagactgtac
 accaaagtacctactatgtgtggactggatcacatcagacaacttattgtttccaaattccactattgg
 gatagtggatgtcccgactaccctttactatgcgtcgtatgcggagactgttccaggatgcctttagt
 ctcaagcacagatattcacacccacgccttcacccatcgcggatggcacttggaaatggcacgg
 20 agaggcagaggtcgacatccacacctaattgcacatggcagcaccacccgcgtggacagcag
 tgattgaggatgcattcgaatgcggatcagcgaatcgcctcaccctgcgcgtggatggccaaac
 tgagcccaacaggctgtcacaaggcggaaaacccctgcgcgcacaaagagagcgggcaccatgt
 gggaccaggagaaaaacaaaattaggcctgtggacagagagattcaagcttattggaaatgaa
 gocagtgaagtgtatgcgtccactcggtggcaggcttttggacttataagggttaatggcacgg
 25 agatgtgcgttgcattaaagatctaaagggtgtcgcggatccaccccgaggacttccaggcctcagg
 gtggcttctgcgcggaaaacacccgcgtgtcgcggatccatgggttgcacatgacaaaggacaac
 gcaattgtgaccaggatgtgtggcggcggcggcggatccatgcgttccaggatgtccaggag
 30 agatgtccaggatgttgcgcggatccatgcgttccaggatgttgcgcggatccatgcgttccagg
 atccatagagacatgaaatccaacaatataattctccatgcggatccatgcgttgcgcggatcc
 ggcaacagatgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgtt
 35 ccaggatgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgc
 ttgtatgactgtatgcggggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgtt
 ccaggatgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgc
 40 gctgactgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgc
 atcaatgtgcacgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgc
 caggggaggaggagaaggccaggcaccacttgcgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgc
 45 agagaagctgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgtt
 ggccttggagaaggaaaggccatgttgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgc
 cccaggcttcgtatgtgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgc
 ggctacatgactgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgc
 50 gggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgc
 ttgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgc
 ttgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgcgttgcgcggatccatgc
 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa). Las moléculas de ácido nucleico de C-RAF mutante pueden seleccionarse
 en células sensibles al tratamiento con un inhibidor de RAF para identificar un ácido nucleico que codifique un
 polipéptido C-RAF mutante en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre que sea resistente al
 tratamiento con el inhibidor de RAF. El polipéptido C-RAF es el C-RAF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) (ID
 de Swiss-Prot n.º P04049-10)

(MEHIQGAWKTISNGFGFKDAVFDGSSCISPTIVQQFGYQRRASDDGKLTDP
SKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVRGLQPECCAVFRLL
HEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLDHVPLTTHNFARKTFLKLAFCDI
CQKFLLNGFRCQTCGYKFHEHCSTKVPTMCVDWSNIRQLLFPNSTIGDSG
VPALPSLTMRRMRESVSRMPVSSQHRYSTPHAFTFNTSSPSSEGSLSQRQ
RSTSTPNVHMVSTTLPVDSRMIEDAIRSHSESASPSALSSSPNNLSPTGWS
QPKTPVPAQRERAPVSGTQEKNKIRPRGQRDSSYYWEIEASEVMLSTRIGS
GSFGTVYKGKWHGDVAVKILKVVDPTEQFQAFRNEAVLRKTRHVNILLF
MGYMTKDNLAIWTQWCEGSSLYKHLHVQETKFQMFQLIDIRQTAQGMDYL
HAKNIIHRDMKSNNIFLHEGLTVKIGDFGLATVKSRSWSQQVEQPTGSVLW
MAPEVIRMQDNNPFSFQSDVYSYGIVLYELMTGELPYSHINNRDQIIFMVGR
GYASPDLSKLYKNCPKAMKRLVADCVKKVKEERPLFPQILSSIELLQHSLPKI
NRSASEPSLHRAAHTEDINACTLTTSPRLPVF).

- Se puede usar cualquier método adecuado para seleccionar los ácidos nucleicos de C-RAF mutantes y los polipéptidos C-RAF mutantes para la resistencia al tratamiento con un inhibidor de RAF. Por ejemplo, se puede expresar una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido C-RAF mutante en células que, de otro modo, serían sensibles al tratamiento con RAF. Una estirpe celular ilustrativa útil para este fin es la estirpe celular de melanoma A375. Tras la expresión del polipéptido C-RAF mutante, las células se pueden tratar con un RAF. La actividad del polipéptido C-RAF mutante puede medirse y compararse luego con la actividad de un polipéptido C-RAF de tipo silvestre expresado de forma similar y tratado con el inhibidor de RAF. La actividad de un polipéptido C-RAF puede determinarse, por ejemplo, midiendo la proliferación o viabilidad de las células después del tratamiento con el inhibidor de RAF, de modo que la proliferación o viabilidad se correlacionan positivamente con la actividad C-RAF. El crecimiento, la proliferación o la viabilidad celulares se pueden determinar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Como se describe en el presente documento, el crecimiento celular se puede determinar usando ensayos de viabilidad/proliferación celular bien fundamentados tales como MTS o Cell Titer GLo, en los que el crecimiento celular en presencia de un inhibidor de RAF se expresa como un porcentaje del observado en células no tratadas cultivadas en ausencia del Inhibidor de RAF. Como se describe en el presente documento, la resistencia se define como un cambio en el valor de IC₅₀ de al menos el doble, más preferentemente, de al menos el triple, lo más preferentemente de al menos 4-5 veces, con respecto a un control adecuado. Como se describe en el presente documento, la resistencia se define como un valor de IC₅₀ de ~ 1 uM). La actividad de un polipéptido C-RAF también puede determinarse, por ejemplo, determinando la cantidad relativa de ERK1/2 fosforilada presente en la célula después del tratamiento con el inhibidor de RAF. La actividad de un polipéptido C-RAF de tipo silvestre o mutante también puede determinarse usando un ensayo de fosforilación *in vitro*, en el que se determina la actividad MEK1 midiendo la proporción de sustrato de ERK1/2 fosforilada en el ensayo después del tratamiento con el inhibidor de RAF o de MEK. Un polipéptido C-RAF mutante que tiene una actividad superior a la de un polipéptido C-RAF de tipo silvestre después del tratamiento con un inhibidor de RAF se identifica como aquel que tiene una mutación que confiere resistencia a un inhibidor de RAF. La mutación que confiere resistencia a un inhibidor de RAF puede identificarse entonces secuenciando el ácido nucleico que codifica el polipéptido C-RAF mutante, o secuenciando directamente el polipéptido C-RAF mutante.
- De esta manera, además de usar métodos de secuenciación paralela masiva, como se describe en el Ejemplo 1, se identificaron sustituciones de aminoácidos en el polipéptido C-RAF que, cuando se mutan, confieren resistencia a los inhibidores de RAF PLX4032, PLX4720 y (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1*H*-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato. En particular, sustituciones en uno o más de los siguientes aminoácidos del polipéptido C-RAF humano confieren resistencia a inhibidores de RAF, entre los que se incluyen 104E, 257S, 261P, 356G, 361G, 427S, 447D, 469M, 478E y 554R. Como se describe en el presente documento, el polipéptido C-RAF mutante incluye una mutación con respecto al polipéptido C-RAF humano de tipo silvestre en uno o más de estos restos de aminoácidos. El polipéptido C-RAF mutante incluye una o más de las siguientes mutaciones de resistencia: 104E>K, 257S>P, 261P>T, 356G>E, 361G>A, 427S>T, 447D>N, 469M>I, 478E>K y 554R>K.

40 Moléculas de ácido nucleico aisladas

La presente divulgación se refiere a polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico relacionadas con el gen C-RAF y su producto génico respectivo. Estos polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico son aislables y purificables a partir de células de mamífero. Como se describe en el presente documento, las moléculas de ácido nucleico de C-

RAF aisladas descritas en el presente documento comprenden una mutación que confiere resistencia a uno o más inhibidores de RAF. Una "molécula de ácido nucleico de C-RAF mutante", como se hace referencia en el presente documento, incluye una molécula de ácido nucleico de C-RAF que codifica un polipéptido C-RAF mutante, *es decir*, un polipéptido C-RAF que incluye una o más mutaciones que confieren resistencia a uno o más inhibidores de RAF.

5 Se contempla que una molécula de ácido nucleico de C-RAF aislada y purificada, *por ejemplo*, una molécula de ácido nucleico de C-RAF mutante, puede adoptar la forma de ARN o ADN. Como se usa en el presente documento, la expresión "producto de transcripción de ARN" se refiere a una molécula de ARN que es el producto de la transcripción de una molécula de ácido nucleico de ADN. Dicho producto de transcripción puede codificar una o más proteínas.

10 Como se usa en la presente solicitud, El término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ARN o ADN, que se ha aislado, tal como que está libre de ácido nucleico genómico total. Por lo tanto, un "polinucleótido que codifica C-RAF" se refiere a un segmento de ácido nucleico que incluye secuencias codificantes de C-RAF, aunque 15 está aislado de, o purificado y libre de, ADN genómico total y proteínas. Cuando la presente solicitud se refiere a la función o actividad de un polinucleótido o ácido nucleico que codifica C-RAF, se entiende que el polinucleótido codifica una molécula que es capaz de realizar una actividad de un polipéptido C-RAF de tipo silvestre, por ejemplo, la fosforilación del sustrato de ERK1/2.

20 El término "ADNc" pretende referirse a ADN preparado usando ARN como molde. También se contempla que un ácido nucleico codificador de C-RAF dado o un gen C-RAF de una célula dada se puede representar mediante variantes naturales o cepas que tienen secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes, pero que, no obstante, codifican un polipéptido C-RAF activo. En una realización preferida, el polipéptido C-RAF activo es un polipéptido C-RAF humano activo. En realizaciones particularmente preferidas, el polipéptido C-RAF activo es un polipéptido C-RAF mutante que tenga una actividad de un polipéptido C-RAF de tipo silvestre, pero que sea resistente a uno o más inhibidores de RAF conocidos. Por consiguiente, en el presente documento, se describen derivados de ácidos 25 nucleicos de C-RAF o polipéptidos C-RAF con mínimos cambios en los ácidos nucleicos o aminoácidos, pero que poseen la misma función biológica.

30 En el presente documento, se describen vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican polipéptidos o péptidos C-RAF mutantes que incluyen en su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua de acuerdo con, o que se corresponde esencialmente, con polipéptidos C-RAF mutantes. En el presente documento, se describen segmentos de ADN aislados y vectores recombinantes que incorporan 35 secuencias de ADN que codifican un polipéptido C-RAF que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua de un polipéptido C-RAF que comprende una o más mutaciones que confieren resistencia a uno o más inhibidores de RAF.

40 Los segmentos de ácido nucleico usados en la presente invención, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, se pueden combinar con otras secuencias de ADN o ARN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes y similares, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que es posible emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y de uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido. Una secuencia "heteróloga" se refiere a una secuencia que es foránea o exógena a la secuencia restante. Un gen 45 heterólogo se refiere a un gen que no se encuentra en la naturaleza adyacente a las secuencias con las que ahora se sitúa.

50 Como se describe en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido C-RAF mutante que tenga actividad C-RAF, en el que se produzca al menos una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de aminoácidos de las siguientes: 104E, 257S, 261P, 356G, 361G, 427S, 447D, 469M, 478E y 554R. Como se describe en el presente documento, el polipéptido C-RAF mutante incluye una o más de las siguientes mutaciones de resistencia: 104E>K, 257S>P, 261P>T, 356G>E, 361G>A, 427S>T, 447D>N, 469M>I, 478E>K y 554R>K.

Vectores de expresión y células hospedadoras

55 En el presente documento, se describen composiciones de vectores de expresión y el uso de dichos vectores para codificar un polipéptido C-RAF, por ejemplo, un polipéptido C-RAF mutante, así como composiciones de células hospedadoras en las que se han introducido dichos vectores de expresión. El término "vector" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que puede introducirse una secuencia de ácido nucleico para la introducción en una célula en la que pueda replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es foránea para la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedador en la que la secuencia no se encuentra normalmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector a través de técnicas recombinantes convencionales.

La expresión "vector de expresión" o "construcción de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen a una proteína, una proteína o un péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden 5 contener una variedad de "secuencias de control", que se refieren a las secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y, posiblemente, la traducción de una secuencia de codificación unida operativamente en un determinado organismo hospedador. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también sirvan para otras funciones.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "célula", "estirpe celular", y "cultivo celular" se pueden usar indistintamente. En la invención, se puede emplear una célula que comprenda un polinucleótido C-RAF, ya sea mutado o de tipo silvestre. Todos estos términos también incluyen su progenie, que se refiere a todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones 15 deliberadas o inadvertidas. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, "célula hospedadora" se refiere a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como receptora de vectores. Una célula hospedadora puede ser "transfectada" o "transformada", lo que se refiere a un proceso mediante el que se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno a la 20 célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula objeto primaria y su progenie. Una "célula hospedadora recombinante" se refiere a una célula hospedadora que porta un ácido nucleico recombinante, es decir, un ácido nucleico que ha sido manipulado *in vitro* o que es una copia replicada de un ácido nucleico que ha sido manipulado de esta manera. Una célula hospedadora puede derivarse de procariotas o eucariotas, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector, la expresión de parte o de la totalidad de las secuencias de ácido 25 nucleico codificadas por el vector, o la producción de partículas víricas infecciosas.

Moléculas polipeptídicas aisladas

30 En el presente documento, se describen polipéptidos C-RAF aislados y/o purificados, y partes biológicamente activas de los mismos. Como se describe en el presente documento, los polipéptidos C-RAF descritos en el presente documento comprenden una mutación en uno o más aminoácidos que confieren resistencia a uno o más inhibidores de RAF. Un "polipéptido C-RAF mutante", como se hace referencia en el presente documento, incluye un polipéptido C-RAF que incluye una mutación en una o más posiciones de aminoácidos que confieren resistencia a uno o más 35 inhibidores de RAF.

35 Las partes biológicamente activas de un polipéptido C-RAF incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido C-RAF, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, que incluyen menos aminoácidos que un polipéptido C-RAF de longitud completa, y muestra al menos una actividad de un polipéptido C-RAF. Normalmente, las partes 40 biológicamente activas (péptidos, por ejemplo, péptidos que son de, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 o más aminoácidos de longitud) comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de un polipéptido C-RAF. Además, otras partes biológicamente activas, en las que se eliminan otras regiones de la 45 proteína, pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse para determinar una o más de las actividades descritas en el presente documento. Preferentemente, las partes biológicamente activas de un polipéptido C-RAF incluyen uno o más dominios/motivos seleccionados o partes de los mismos que tienen actividad biológica.

50 Los polipéptidos C-RAF pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, se clona una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína en un vector de expresión (como se ha descrito anteriormente), se introduce el vector de expresión en una célula hospedadora (como se ha descrito anteriormente) y se expresa el polipéptido C-RAF en la célula hospedadora. El polipéptido C-RAF se puede aislar luego de las células mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Como alternativa a la expresión recombinante, se puede sintetizar químicamente un polipéptido C-RAF usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales. Además, se puede aislar un polipéptido C-RAF nativo y/o un polipéptido C-RAF mutante a partir de células (por ejemplo, células cancerosas), por ejemplo, usando un anticuerpo anti-C-RAF, que puede producirse mediante técnicas convencionales utilizando un polipéptido C-RAF o fragmento del mismo como se describe en el presente documento.

55 También se pueden usar proteínas quiméricas o de fusión C-RAF. Como se usa en el presente documento, una "proteína químérica" MEK1 o "proteína de fusión" MEK1 comprende un polipéptido C-RAF unido operativamente a un polipéptido que no es C-RAF. Un "polipéptido C-RAF" se refiere a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido C-RAF, mientras que un "polipéptido no C-RAF" se refiere a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homólogo al polipéptido C-RAF, *por ejemplo*, una proteína que es sustancialmente diferente del polipéptido C-RAF, que no muestra actividad C-RAF y que se deriva del mismo organismo o de un organismo diferente. Dentro de la proteína de fusión, la expresión "unido operativamente" pretende indicar que el polipéptido C-RAF y el polipéptido

- que no es C-RAF están fusionados en fase entre sí. El polipéptido que no es C-RAF puede fusionarse al extremo N o al extremo C del polipéptido C-RAF. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-C-RAF, en la que los aminoácidos de C-RAF se fusionan con el extremo C del polipéptido GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación del polipéptido C-RAF recombinante.
- 5 Como se describe en el presente documento, la proteína de fusión es un polipéptido C-RAF que contenga una secuencia señal heteróloga en su extremo N. En ciertas células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras de mamífero), la expresión y/o secreción de una proteína MEK1 puede aumentarse mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.
- 10 El polipéptido C-RAF mutante se puede generar mediante la mutagénesis de un polipéptido C-RAF de tipo silvestre, o de la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido C-RAF de tipo silvestre. El polipéptido C-RAF mutante también puede identificarse seleccionando bibliotecas combinatorias de mutantes de C-RAF para un polipéptido C-RAF mutante que tenga una actividad deseada, por ejemplo, resistencia a uno o más inhibidores de RAF. Se conocen varias técnicas en la materia para seleccionar productos génicos de genotecas combinatorias preparadas mediante mutaciones puntuales o truncamiento, y para explorar genotecas de ADNc en busca de productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas se pueden adaptar a la exploración rápida de las genotecas generadas por mutagénesis combinatoria. Las técnicas más ampliamente usadas, que son susceptibles del análisis de alto rendimiento, para la exploración de grandes genotecas normalmente incluyen la clonación de la genoteca en vectores de expresión replicables, la transformación de las células apropiadas con la genoteca resultante de vectores, y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento del vector codificante del gen cuyo producto se detectó.
- 15
- 20

Anticuerpos

- 25 Los polipéptidos expresados a partir de los polinucleótidos de la invención pueden usarse para generar anticuerpos. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos pueden usarse para detectar y cuantificar la expresión de los polipéptidos C-RAF mutantes. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos se pueden usar para alterar la actividad de un polipéptido C-RAF mutante. Los polipéptidos expresados a partir de los polinucleótidos de la invención que comprenden al menos seis, ocho, diez, doce, quince, veinte o treinta aminoácidos consecutivos se pueden usar como inmunógenos. Los polipéptidos pueden usarse para obtener una preparación de anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido C-Raf mutante como se describe en el presente documento, que tiene una o más sustituciones en uno o más de los siguientes aminoácidos del polipéptido C-RAF humano que confieren resistencia a inhibidores de RAF que incluyen 104E, 257S, 261P, 356G, 361G, 427S, 447D, 469M, 478E y 554R. De acuerdo con la presente invención, el polipéptido C-RAF mutante incluye una o más de las siguientes mutaciones de resistencia: 104E>K, 257S>P, 261P>T, 356G>E, 361G>A, 427S>T, 447D>N, 469M>I, 478E>K y 554R>K..
- 30
- 35

40 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos químéricos, anticuerpos bifuncionales/biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos injertados en la región determinante de la complementariedad (CDR), que son específicos para la proteína diana o fragmentos de la misma; e incluyen también fragmentos de anticuerpos, incluyendo Fab, Fab', F(ab')2, scFv, Fv, anticuerpos de camello o microanticuerpos. Un anticuerpo también puede referirse a un anticuerpo anti-idiotípico, es decir, un anticuerpo dirigido contra la parte específica del antígeno de la secuencia de un anticuerpo y, por lo tanto, reconoce los sitios de unión de otros anticuerpos; o un anticuerpo anti-anti-idiotípico, es decir, un anticuerpo con un sitio de combinación que imita el epítopo en el antígeno que se usó para generar el anticuerpo original. Las técnicas para generar anticuerpos son bien conocidas en la materia.

45

50 También se pueden construir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios que se unen específicamente a un polipéptido expresado a partir de los polinucleótidos de la invención se pueden aislar, por ejemplo, de bibliotecas de presentación de inmunoglobulina monocatenaria, como se conoce en la técnica. La biblioteca se "selecciona" frente a un polipéptido, y se pueden aislar varios anticuerpos monocatenarios que se unen a diferentes epítopos del polipéptido con alta afinidad. Hayashi *et al.*, 1995, *Gene* 160: 129-30. Dichas bibliotecas son conocidas y están disponibles para los expertos en la materia. Los anticuerpos también pueden construirse usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando ADNc de hibridoma como molde. Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prey.* 5: 507-11.

55

55 El anticuerpo monocatenario puede ser monoespecífico o biespecífico, y puede ser bivalente o tetravalente. La construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos tetravalentes se enseña en Coloma y Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15: 159-63. La construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos bivalentes se describe en Mallender y Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269: 199-206.

60

60 Se puede construir entonces una secuencia de nucleótidos que codifique el anticuerpo monocatenario usando la síntesis de nucleótidos manual o automática, clonarse en vectores de expresión de ADN usando metodologías de ADN recombinante convencionales, e introducirse en células que expresen el gen seleccionado, como se describe más adelante. Como alternativa, los anticuerpos pueden producirse directamente usando tecnología de fagos filamentosos, Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61:497-501; Nicholls *et al.*, 1993. *J. Immunol. Meth.* 165:81-91.

65

Los anticuerpos se pueden unir específicamente a los epítopos de los polipéptidos expresados a partir de los polinucleótidos de la invención. Como se describe en el presente documento, los epítopos no están presentes en otras proteínas humanas. Por lo general, un número mínimo de aminoácidos contiguos para codificar un epítopo es de 6, 8 o 10. Sin embargo, se pueden usar más, por ejemplo, al menos 15, 25 o 50, en especial, para formar epítopos que incluyan restos no contiguos o determinadas configuraciones.

Los anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos incluyen aquellos que se unen a polipéptidos de longitud completa. Los anticuerpos de unión específica no detectan otras proteínas en transferencias Western de células humanas, o proporcionan una señal al menos diez veces inferior a la señal proporcionada por la proteína diana de la invención. Los anticuerpos que tienen dicha especificidad se pueden obtener mediante una selección rutinaria. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos inmunoprecipitan los polipéptidos expresados a partir de los polinucleótidos de la invención desde extractos o soluciones celulares. Además, los anticuerpos pueden reaccionar con polipéptidos expresados a partir de los polinucleótidos de la invención en secciones de tejido o en transferencias Western de geles de poliacrilamida. Preferentemente, los anticuerpos no muestran reactividad cruzada inespecífica con otras proteínas humanas en transferencias Western o en ensayos inmunocitoquímicos.

Las técnicas de purificación de anticuerpos a los polipéptidos expresados a partir de los polinucleótidos de la invención están disponibles en la materia. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos se pasan a través de una columna a la que se une una proteína o un polipéptido particular expresado a partir de los polinucleótidos de la invención. Luego se eluyen los anticuerpos unidos, por ejemplo, con un tampón que tenga una alta concentración de sal.

Detección de mutaciones

En el presente documento, se describen métodos para detectar la presencia de un polipéptido C-RAF mutante en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica de un paciente con cáncer). Se puede usar una variedad de métodos de selección para detectar la presencia de un polipéptido C-RAF mutante de la invención en una muestra, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico y/o una muestra de proteína. En la presente invención, la muestra incluye una célula o extracto celular. En realizaciones a modo de ejemplo, la muestra se obtiene de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer.

Se pueden usar métodos para detectar la presencia de mutaciones de resistencia en ADN genómico, ADNc y ARN (es decir, ARNm) que contienen una secuencia codificante de un polipéptido C-RAF, o una parte biológicamente activa del mismo dentro del alcance de la presente invención. Asimismo, se pueden usar métodos para detectar la presencia de mutaciones de resistencia en el polipéptido C-RAF, o partes biológicamente activas del mismo dentro del alcance de la presente invención. En realizaciones particulares, los métodos incluyen, pero sin limitación, los siguientes, que se pueden usar para detectar la presencia de un polipéptido C-RAF, o una molécula de ácido nucleico codificante del polipéptido C-RAF, que tenga una mutación en una o más posiciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido C-RAF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos a un polipéptido C-RAF mutante pueden usarse para detectar la presencia del polipéptido mutante.

Las mutaciones puntuales pueden detectarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, entre los que se incluyen, por ejemplo, la electroforesis en gel con gradiente de desnaturación ("DGGE"), el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción ("RFLP"), métodos de escisión química o enzimática, la secuenciación directa de regiones diana amplificadas por PCR (véase más arriba), el análisis de polimorfismos de configuración monocatenaria ("SSCP"), la reacción en cadena de la polimerasa, la secuenciación, la hibridación o "captura híbrida" seguida de la pirosecuenciación o secuenciación de una sola molécula. También se pueden usar otros métodos para detectar mutaciones conocidas por los expertos en la materia.

Se pueden realizar métodos de selección para examinar a un individuo en busca de la aparición de las mutaciones identificadas anteriormente. Por ejemplo, en una realización, se toma una muestra (tal como una muestra de sangre u otro fluido corporal o células o tejido) de un paciente para su análisis. En una realización a modo de ejemplo, el paciente es un paciente con cáncer. Los métodos adecuados para procesar dichas muestras para la detección de una mutación en un ácido nucleico de C-RAF o un polipéptido C-RAF son conocidos en la técnica, y el experto en la materia puede adaptar el procesamiento de dichas muestras de acuerdo con el método de detección escogido.

La presencia o ausencia de una o más mutaciones descritas en el presente documento determina la probabilidad de que los individuos explorados resistan el tratamiento con un inhibidor de RAF. De acuerdo con la presente invención, estos resultados se usarán para seleccionar un ciclo de tratamiento usando un segundo inhibidor. En algunas realizaciones, el segundo inhibidor puede ser un inhibidor de MEK. Los resultados se pueden usar para ajustar y/o alterar la dosis del inhibidor de RAF. El tratamiento eficaz de un sujeto que tiene cáncer puede comprender la erradicación de una célula cancerosa, el cese o la reducción de la velocidad de crecimiento del cáncer (tal como del tumor sólido), o la mejoría de al menos un síntoma de cáncer.

Las mutaciones de resistencia en el polipéptido C-RAF, o en moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido C-RAF, pueden detectarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, o modificaciones del mismo,

incluyendo los métodos descritos a continuación. Dichos métodos incluyen el uso de la reacción en cadena de la polimerasa específica del alelo, la secuenciación directa o indirecta del sitio, el uso de enzimas de restricción en las que los respectivos alelos del sitio crean o destruyen un sitio de restricción, el uso de sondas de hibridación específicas del alelo, el uso de anticuerpos que son específicos del polipéptido C-RAF mutante, o cualquier otra interpretación bioquímica.

5 Marcadores de diagnóstico/pronóstico de la resistencia a terapias dirigidas

10 En el presente documento, se describen métodos para detectar la presencia de uno o más marcadores de diagnóstico o de pronóstico en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica de un paciente con cáncer). Se puede usar una variedad de métodos de selección conocidos por los expertos en la materia para detectar la presencia del marcador en la muestra que incluye la detección de ADN, ARN y proteína. Las técnicas se pueden usar para determinar la presencia o ausencia de una mutación en una muestra obtenida de un paciente.

15 El paciente puede tener resistencia innata o adquirida a terapias dirigidas a quinasas, que incluyen inhibidores de B-RAF o inhibidores de pan-RAF. Por ejemplo, el paciente puede tener una resistencia innata o adquirida a los inhibidores de RAF PLX4720 y/o PLX4032 y/o (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1H-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato. En un aspecto, la identificación de un ácido nucleico o polipéptido C-RAF que incluye una o más mutaciones descritas en el presente documento en una muestra 20 que contiene células cancerosas obtenida de un paciente indica que el paciente tiene un riesgo relativamente alto de recaída o falta de respuesta al tratamiento con un inhibidor de RAF. La identificación de una o más mutaciones C-RAF descritas anteriormente en un paciente ayuda al médico a determinar e implementar un protocolo de tratamiento para el paciente. Por ejemplo, en un paciente que tiene una o más mutaciones en el polipéptido C-RAF identificadas anteriormente, el médico puede tratar al paciente con una terapia de combinación como se describe 25 con más detalle a continuación.

30 La identificación de mutaciones de resistencia en el polipéptido C-RAF también permite la exploración de pacientes que tienen un cáncer con el fin de determinar la presencia o ausencia de una mutación de resistencia C-RAF en una o más posiciones de aminoácidos en el cáncer. La determinación de la presencia o ausencia de una o más mutaciones de resistencia C-RAF en un cáncer permite la modificación de la estrategia de tratamiento de un paciente con cáncer. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, iniciar o interrumpir el tratamiento con un inhibidor de RAF o un inhibidor de MEK, administrar una terapia de combinación, proporcionar la dosificación secuencial de un inhibidor de RAF y un segundo inhibidor, y similares.

35 Como se describe en el presente documento, las mutaciones de resistencia RAF se pueden identificar en un ácido nucleico que codifica un polipéptido C-RAF mutante que tiene actividad C-RAF, en el que el polipéptido C-RAF mutante incluye al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre mostrado en SEQ ID NO: 2 y en el que la al menos una sustitución de aminoácido confiere resistencia a uno o más inhibidores de RAF en una célula que expresa el polipéptido RAF mutante. Como se describe en el presente 40 documento, las mutaciones de resistencia RAF pueden identificarse en un polipéptido C-RAF mutante que tiene actividad C-RAF, en el que el polipéptido C-RAF mutante incluye al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre mostrado en SEQ ID NO: 2, y en el que la al menos una sustitución de aminoácido confiere resistencia a uno o más inhibidores de RAF en una célula que expresa el polipéptido C-RAF mutante. Como se describe en el presente documento, la sustitución en uno o más de los 45 siguientes aminoácidos del polipéptido C-RAF de tipo silvestre confiere resistencia a inhibidores de RAF, entre las que se incluyen 104E, 257S, 261P, 356G, 361G, 427S, 447D, 469M, 478E y 554R. De acuerdo con la presente invención, la sustitución de uno o más aminoácidos del polipéptido C-RAF de tipo silvestre se selecciona del grupo que consiste en 104E>K, 257S>P, 261P>T, 356G>E, 361G>A, 427S>T, 447D>N, 469M>I, 478E>K y 554R>K. Como se describe en el presente documento, la sustitución de uno o más aminoácidos del polipéptido C-RAF de tipo 50 silvestre se selecciona del grupo que consiste en 257S, 261P y 361G.

Métodos de tratamiento

55 En el presente documento, se describen métodos para el tratamiento de un paciente que tiene cáncer. Se debe entender que la invención no abarca métodos de tratamiento de por sí, sino inhibidores de B-RAF para su uso en dichos métodos. En general, los métodos comprenden la administración de un primer inhibidor y de un segundo inhibidor. Un inhibidor puede ser un inhibidor de RAF. En la Tabla 1 anterior, se muestran inhibidores de RAF a modo de ejemplo. Un inhibidor puede ser un inhibidor de MEK (véase la Tabla 2 que ilustra inhibidores de MEK de ejemplo). En el presente documento, se describe una terapia de combinación para el cáncer, que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de RAF y una cantidad eficaz de un segundo inhibidor. En algunas realizaciones, el segundo inhibidor es un inhibidor de MEK.

60 En realizaciones a modo de ejemplo de los aspectos anteriores, el inhibidor de RAF proporcionado en el presente documento es PLX4720, PLX4032, BAY 43-9006 (Sorafenib), ZM 336372, RAF 265, AAL-881, LBT-613, (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1H-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato o CJS352. Los ejemplos adicionales de inhibidores de RAF útiles para la terapia de combinación incluyen inhibidores

de pan-RAF, inhibidores de B-RAF, inhibidores de A-RAF e inhibidores de RAF-1. Se pueden usar también inhibidores de RAF adicionales conocidos en la técnica.

Como un ejemplo no limitante, el inhibidor de MEK proporcionado en el presente documento puede ser CI-1040, AZD6244, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119, 6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-4-(4-fenoxi-fenilamino)-quinolin-3-carbonitrilo o 4-[3-cloro-4-(1-metil-1*H*-imidazol-2-ilsulfanil)-fenilamino]-6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinolin-3-carbonitrilo, el compuesto de Roche RG7420, o combinaciones de los mismos. También se pueden usar inhibidores de MEK adicionales conocidos en la técnica.

- 5 La administración de la combinación incluye la administración de la combinación en una sola formulación o forma de dosificación unitaria, la administración de los agentes individuales de la combinación al mismo tiempo, pero por separado, o la administración de los agentes individuales de la combinación secuencialmente mediante cualquier vía adecuada. La dosificación de los agentes individuales de la combinación puede requerir una administración más frecuente de uno de los agentes en comparación con el otro agente de la combinación. Por lo tanto, para permitir la dosis apropiada, los productos farmacéuticos envasados pueden contener una o más formas farmacéuticas que contengan la combinación de agentes, y una o más formas farmacéuticas que contengan una de las combinaciones de agentes, pero no el/los otro/s agente/s de la combinación.
- 10

15 Los agentes pueden contener uno o más elementos asimétricos tales como centros estereogénicos o ejes estereogénicos, por ejemplo, átomos de carbono asimétricos, de modo que los compuestos pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas. Estos compuestos pueden ser, por ejemplo, racematos o formas ópticamente activas. Para los compuestos con dos o más elementos asimétricos, estos compuestos pueden ser además mezclas de diastereómeros. Para los compuestos que tienen centros asimétricos, se ha de entender que se engloban todos los isómeros ópticos y mezclas de los mismos. Además, los compuestos con dobles enlaces carbono-carbono pueden darse en las formas Z y E; todas las formas isoméricas de los compuestos están incluidas en la presente invención. En estas situaciones, los enantiómeros individuales (formas ópticamente activas) se pueden obtener mediante síntesis asimétrica, síntesis a partir de precursores ópticamente puros, o mediante la resolución de los racematos. La resolución de los racematos también se puede realizar, por ejemplo, mediante métodos convencionales tales como cristalización en presencia de un agente de resolución, o cromatografía, usando, por ejemplo, una columna de HPLC quiral.

20

25 A menos que se especifique lo contrario, o se indique claramente por el texto, la referencia a compuestos útiles en la terapia de combinación de la invención incluye tanto la base libre de los compuestos, como todas las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos. Una sal preferida es la sal de clorhidrato.

30

35 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" incluye derivados de los compuestos desvelados, en los que el compuesto precursor se modifica al preparar sus sales de adición de ácido o base no tóxicas, y se refiere además a solvatos farmacéuticamente aceptables, incluyendo hidratos, de dichos compuestos y de dichas sales. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sales de adición de ácidos minerales u orgánicos de restos básicos tales como aminas; sales de adición de base u orgánica de restos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares, y combinaciones que comprenden una o más de las sales anteriores. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales no tóxicas y las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, las sales ácidas no tóxicas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico y nítrico; otras sales inorgánicas aceptables incluyen sales metálicas tales como sal de sodio, sal de potasio y sal de cesio; y sales de metales alcalinotérreos, tales como sal de calcio y sal de magnesio; y combinaciones que comprenden una o más de las sales anteriores.

40

45 Las sales orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como ácido acético, trifluoroacético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, mesílico, esfílico, besílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, HOOC(CH₂)_nCOOH, en el que n es 0-4; sales de amina orgánica tales como sales de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal de trietanolamina, sal de diciclohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina; y sales de aminoácidos tales como arginato, asparaginato y glutamato, y combinaciones que comprenden una o más de las sales anteriores.

50

55 Una "cantidad eficaz" de una combinación de agentes es una cantidad suficiente para proporcionar una mejora observable con respecto a los signos y síntomas clínicamente observables iniciales del trastorno tratado con la combinación.

60

65 Los productos farmacéuticos se pueden administrar por vía oral u otras formas, por ejemplo, por vía rectal o mediante inyección parenteral. "Forma farmacéutica oral" pretende incluir una forma de dosificación unitaria prescrita o destinada a la administración oral. Una forma farmacéutica oral puede comprender o no una pluralidad de subunidades, tales como, por ejemplo, microcápsulas o microcomprimidos, envasadas para la administración en una sola dosis.

Los productos farmacéuticos se pueden liberar de diversas formas. La "forma liberable" pretende incluir formas de liberación instantánea, de liberación inmediata, de liberación controlada y de liberación sostenida.

5 La "liberación instantánea" pretende incluir una forma farmacéutica diseñada para garantizar una disolución rápida del agente activo modificando la forma cristalina normal del agente activo para obtenerse una disolución más rápida.

10 La "liberación inmediata" pretende incluir una forma de liberación convencional o no modificada en la que se libera una cantidad superior o igual al aproximadamente 50 %, o más preferentemente, del aproximadamente 75 % de los agentes activos en las dos horas de la administración, preferentemente en una hora de la administración.

15 "Liberación sostenida" o "liberación prolongada" incluyen la liberación de agentes activos a una velocidad tal que los niveles en sangre (por ejemplo, en plasma) se mantienen dentro de un intervalo terapéutico, pero por debajo de niveles tóxicos durante al menos aproximadamente 8 horas. Preferentemente, al menos aproximadamente 12 horas, más preferentemente, aproximadamente 24 horas después de la administración en estado estacionario. La expresión "estado estacionario" significa que se ha alcanzado un nivel en plasma para un agente activo o una combinación de agentes activos dados, y que se mantiene con dosis posteriores de agente/s activo/s en un nivel que es igual o superior al mínimo nivel terapéutico eficaz y que está por debajo del mínimo nivel tóxico en plasma para uno o varios de los agentes activos dados.

20 20 El término "tratar", "tratado", o "tratamiento" se usa en el presente documento para referirse a calmar, reducir o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad en un sujeto. Por ejemplo, el tratamiento puede ser la disminución de uno o varios síntomas de un trastorno o la erradicación completa de un trastorno, tal como el cáncer. En el sentido de la presente invención, el término "tratar" también denota la detención, el retraso del inicio (es decir, el período anterior a la manifestación clínica de una enfermedad) y/o la reducción del riesgo de desarrollar o empeorar una enfermedad. El término "proteger" se usa en el presente documento para referirse a evitar el retraso o el tratamiento, o ambas cosas, según sea apropiado, el desarrollo o la continuación o el agravamiento de una enfermedad en un sujeto. En el sentido descrito en el presente documento, la enfermedad está asociada a un cáncer.

30 30 El término "sujeto" o "paciente" pretende incluir animales, que son capaces de padecer o estar afectados por un cáncer o cualquier trastorno que implique, directa o indirectamente, un cáncer. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que padece, que corre el riesgo de padecer o que puede padecer cáncer.

35 40 El término "aproximadamente" normalmente significa dentro del 20 %, más preferentemente dentro del 10 % y lo más preferentemente dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. Como alternativa, en especial, en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un registro (es decir, un orden de magnitud) preferentemente dentro de un factor de dos de un valor dado.

45 50 El uso de los términos "un" y "una", y "el" y "ella", y los referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente con el contexto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" deben interpretarse como expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye, pero sin limitación") a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento simplemente tiene la intención de servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor por separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor por separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento.

55 60 Como se ha especificado anteriormente, en un aspecto, la presente invención proporciona una combinación de fármacos útil para tratar, prevenir, interrumpir, retrasar el inicio y/o reducir el riesgo de desarrollar, o revertir al menos un síntoma de cáncer, en un sujeto que comprende administrar al sujeto una terapia de combinación, que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de RAF y de un segundo inhibidor. En algunas realizaciones, el segundo inhibidor es un inhibidor de MEK. Preferentemente, estos inhibidores se administran a dosis terapéuticamente eficaces que, cuando se combinan, proporcionan un efecto beneficioso. La administración puede ser simultánea o consecutiva.

65 65 65 El término "cáncer" se usa en el presente documento para referirse a un amplio espectro de tumores, que incluyen todos los tumores sólidos y malignidades hematológicas. Los ejemplos de dichos tumores incluyen, pero sin limitación, leucemias, linfomas, mielomas, carcinomas, carcinomas metastásicos, sarcomas, adenomas, cánceres del sistema nervioso y cánceres gertorretinianos. En realizaciones a modo de ejemplo, el cáncer de la presente invención puede ser cualquiera una de la leucemia linfoblástica aguda de adultos y pediátrica, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, cáncer de ano, cáncer del apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso,

osteosarcoma, histiocitoma fibroso, cáncer de cerebro, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico, cáncer de mama, cáncer de mama masculino, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, tumores carcinoides, carcinoma de origen desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, glioma maligno, cáncer de cuello uterino, cánceres en la infancia, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos crónicos mieloproliferativos, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer del endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, tumores de la familia Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer del conducto biliar extrahepático, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores estromales gastrointestinales, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales ováricas, tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer hipofaringeo, glioma hipotalámico y de la vía óptica, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de células renales, cáncer de laringe, cáncer de labios y de la cavidad oral, cáncer microcítico de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenstrom, histiocitoma fibroso maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, cáncer de cuello escamoso, síndrome múltiple de neoplasia endocrina, mieloma múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, trastornos mieloproliferativos, trastornos crónicos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer paratiroides, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de la hipófisis, neoplasia de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, rabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel no melanómico, cáncer del intestino delgado, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales, tumores trofoblásticos, cáncer de la uretra, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de la vulva y tumor de Wilms.

En particular, el cáncer puede estar asociado a una mutación en el gen B-RAF. En algunas realizaciones, el cáncer de la presente invención puede ser un cáncer dependiente de RAF. Estos cánceres incluyen, pero sin limitación, melanoma, cáncer de mama, cánceres colorrectales, glioma, cáncer pulmonar, cáncer ovárico, sarcoma y cáncer tiroideo.

En una realización particular, la combinación terapéutica de la presente invención es eficaz para el tratamiento de cáncer moderado a grave en un sujeto.

Dosificaciones

La dosis óptima de la combinación de agentes para el tratamiento del cáncer se puede determinar empíricamente para cada sujeto usando métodos conocidos, y dependerá de una variedad de factores, entre los que se incluyen la actividad de los agentes; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la alimentación del sujeto; el tiempo y la vía de administración; y otros medicamentos que esté tomando el sujeto. Las dosis óptimas se pueden establecer usando pruebas de rutina y procedimientos que son bien conocidos en la técnica.

La cantidad de combinación de agentes que puede combinarse con los materiales portadores para producir una sola forma farmacéutica variará dependiendo del individuo tratado y del modo particular de administración. Como se describe en el presente documento, las formas de dosificación unitaria que contienen la combinación de agentes descrita en el presente documento contendrán las cantidades de cada agente de la combinación que normalmente se administran cuando los agentes se administran solos.

Un médico o veterinario que tenga experiencia en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría empezar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado e ir aumentando gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado.

En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz, en general, dependerá de los factores descritos anteriormente y la determinará fácilmente un experto en la materia.

En general, las dosis terapéuticamente eficaces de los compuestos de esta invención para un paciente, cuando se usan para los efectos analgésicos indicados, variarán de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1.000 mg por kilogramo de peso corporal por día, más preferentemente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg al día.

Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día, opcionalmente, en formas monodosis.

5 Formulaciones farmacéuticas y vía de administración

En el presente documento, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden una combinación de agentes para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, melanoma. Las formulaciones farmacéuticas también pueden comprender un vehículo o excipiente, estabilizante, agente aromatizante y/o agente colorante.

10 En el presente documento, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden una combinación de agentes que puede ser, por ejemplo, una combinación de dos tipos de agentes: (1) un inhibidor de RAF y/o metabolitos, sales, solvatos y racematos farmacológicamente activos del inhibidor y (2) un inhibidor de MEK y/o metabolitos, sales, solvatos y racematos farmacológicamente activos del inhibidor de MEK.

15 La combinación de agentes se puede administrar usando una variedad de vías de administración conocidas por los expertos en la materia. La combinación de agentes puede administrarse a seres humanos y a otros animales por vía oral, parenteral, sublingual, por aerosolización o inhalación, por vía rectal, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, bucal o tópica en formulaciones de dosificación unitaria que contengan portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales según lo deseado. La administración tópica también puede implicar el uso de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de ionoforesis. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión.

20 25 Los métodos de formulación son bien conocidos en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19^a Edición (1995). Las composiciones farmacéuticas para el uso en la presente invención pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas, no pirogénicas, estériles, cápsulas recubiertas, supositorios, polvos liofilizados, parches transdérmicos u otras formas conocidas en la técnica.

30 35 40 45 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, tal como una solución en 1,3-propanodiol o 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer, U. S. P. y solución de cloruro sódico isotónica. Además, se usan convencionalmente aceites no volátiles estériles en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico, encuentran uso en la preparación de los inyectables. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

50 55 60 Para prolongar el efecto de un fármaco, es a menudo deseable ralentizar la absorción del fármaco mediante inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende por tanto de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, se puede lograr la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción del fármaco con respecto al polímero y de la naturaleza del polímero concreto empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se pueden preparar formulaciones inyectables de depósito atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con los tejidos corporales.

65 Las composiciones para la administración rectal o vaginal son preferentemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de esta invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para suppositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se derretirán en el recto o en la cavidad vaginal y liberarán el compuesto activo.

70 Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas sólidas de dosificación, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcicio y/o a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, a) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polvinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales

- como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la solución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica puede comprender agentes tamponantes.
- 5 También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.
- 10 Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición que libera el principio o los principios activos única, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones inclusoras que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.
- 15 20 Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes, como se ha indicado anteriormente. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas farmacéuticas también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para formación de comprimidos y otros adyuvantes para la compresión, tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición que libera el principio o los principios activos única, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones inclusoras que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.
- 25 30 35 Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, EtOAc, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semillas de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes.
- 40 45 50 Las formas farmacéuticas para administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizados, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla previamente en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario, según se requiera. También se contempla que están comprendidas en el alcance de esta invención las formulaciones oftálmicas, gotas para los oídos y similares.
- 55 60 65 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos. Las composiciones de la invención también pueden formularse para la administración como un aerosol líquido o polvo seco inhalable. Las formulaciones de aerosoles líquidos pueden nebulizarse predominantemente en tamaños de partículas que puedan administrarse a los bronquiolos terminales y respiratorios. Las formulaciones aerosolizadas de la invención pueden administrarse usando un dispositivo de formación de aerosol, tal como un nebulizador de chorro, nebulizador de placa porosa vibrante o nebulizador ultrasónico, seleccionado preferentemente para permitir la formación de partículas de aerosol que tengan un diámetro medio de masa predominantemente entre 1 y 5 µm. Además, la formulación preferentemente tiene una fuerza iónica de osmolaridad y una concentración de cloruro equilibradas, y el menor volumen aerosolizable capaz de administrar una dosis eficaz de los compuestos de la invención al sitio de la infección. Además, la formulación aerosolizada preferentemente no perjudica negativamente a la funcionalidad de las vías respiratorias y no causa efectos secundarios no deseados.

Los dispositivos de aerosoles adecuados para la administración de formulaciones de aerosol de la invención incluyen, por ejemplo, nebulizadores de chorro, nebulizadores de placa porosa vibratoria, nebulizadores ultrasónicos e inhaladores de polvo seco energizados, que son capaces de nebulizar la formulación de la invención en partículas de tamaño de aerosol predominantemente en el intervalo de tamaño de 1 a 5 µm. Predominantemente en esta aplicación significa que al menos el 70 %, pero preferentemente más del 90 % de todas las partículas de aerosol generadas están dentro del intervalo de 1 a 5 µm. Un nebulizador de chorro funciona por presión de aire para romper una solución líquida en gotitas de aerosol. Los nebulizadores de placa porosa vibrante funcionan usando un vacío sónico producido por una placa porosa que vibra rápidamente para extruir una gotita de disolvente a través de una placa porosa. Un nebulizador ultrasónico funciona con un cristal piezoeléctrico que corta un líquido en pequeñas gotas de aerosol. Hay disponible una variedad de dispositivos adecuados, entre los que se incluyen, por ejemplo, los nebulizadores de placa porosa vibratoria AERONEB y AERODOSE (AeroGen, Inc., Sunnyvale, California), Nebulizadores SIDESTREAM (Medic Aid Ltd., West Sussex, Inglaterra), nebulizadores de chorro PARI LC y PARI LC STAR (Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Virginia), y y los nebulizadores ultrasónicos AEROSONIC (DeVilbiss Medizinische Produkte (Deutschland) GmbH, Heiden, Alemania) y ULTRAIR (Omron Healthcare, Inc., Vernon Hills, Illinois).

Los compuestos de la invención también pueden formularse para su uso como polvos tópicos y pulverizados que pueden contener, además de los compuestos de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos cárnicos y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los pulverizados pueden contener además propulsores habituales tales como clorofluorohidrocarburos.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al organismo. Dichas formas farmacéuticas pueden prepararse disolviendo o dispensando el compuesto en el medio adecuado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel. Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de liposomas. Como es sabido en la técnica, los liposomas, en general, se obtienen de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados monolaminares o multilaminares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizantes, conservantes, excipientes, y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos de formación de liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott (ed.), "Methods in Cell Biology", Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, 1976, p. 33 et seq.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación y caracterización de mutaciones de resistencia CRAF *in vitro*.

Para identificar mutaciones RAF somáticas que confieren resistencia a los inhibidores de RAF, se realizaron selecciones de mutagénesis aleatoria de saturación usando el sistema bacteriano XL1-Red y vectores retrovíricos que expresaban ADNc de C-RAF (Emery *et al.*, *Id.* 2009, Wagle *et al.*, *Id.* 2011). La genoteca de ADNc de saturación sometida a mutagénesis aleatoria resultante de mutaciones CRAF se expresó en células de melanoma A375 portadoras de la mutación BRAF^{V600E}, que es altamente sensible a los inhibidores de RAF (Li *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2008, Emery *et al.*, *Id.* 2009). Estas células se cultivaron durante 4 semanas en presencia de concentraciones totalmente inhibidoras de PLX4720 (1,5 µM), y se combinaron los clones resistentes emergidos y se caracterizaron mediante secuenciación paralela masiva (Emery *et al.*, 2009, Wagle *et al.*, *Id.* 2011). Todas las mutaciones C-RAF examinadas (Fig. 1A) pudieron expresarse de manera estable en células A375. (Fig. 9A). Además, 8 de las 10 mutaciones C-RAF más destacadas confieren resistencia bioquímica al inhibidor de RAF PLX4720 en células A375, como lo demuestran los niveles de p-MEK y de p-ERK (Fig. 9B). Uno de estos alelos (CRAF^{G361A}) confirió activación "paradójica" sustancial de p-MEK a altas concentraciones de PLX4720 (Fig. 9B).

Las mutaciones CRAF obtenidas a través de la exploración se cartografiaron en la estructura cristalina del dominio CRAF quinasa (340-618) (Hatzivassiliou *et al.*, 2010) (código PDB: 30MV) (Fig. 1B). Tres de las mutaciones no fueron cartografiadas, ya que, hasta la fecha, no se ha resuelto la estructura completa de CRAF. Los alelos de resistencia CRAF se agruparon hacia dos regiones distintas, fuera o dentro de la región reguladora (extremo N) y en el dominio quinasa (extremo C) (Fig. 1C). CRAF consiste en dos sitios de unión consenso a 14-3-3, y dos de los alelos de resistencia S257P y P261T ocuparon uno de los sitios de unión consenso a 14-3-3 en el CR2, excepto el alelo E104K en la región CR1 (Fig. 1B).

La segunda categoría de alelos de resistencia abarca el dominio quinasa, que incluye el bucle rico en glicina. Se encontraron mutaciones tales como G356E y G361A en el resto de glicina del bucle P de unión a ATP, motivo GxGxxG. Las mutaciones del bucle P se han encontrado en varias proteínas quinasa (Christopher *et al.*, 2007), que incluyen BRAF que poseen capacidad de transformación celular mediante la activación de Mek (Wan *et al.*, *Cell* 116:

855-867, 2004; Garnett *et al.*, *Id.* 2005). El otro subconjunto de mutaciones (S427T, D447N, M469I, E478K y R554K) se poblaron fuera del segmento de activación (Fig. 1B).

Ejemplo 2: Caracterización funcional de mutantes de resistencia C-RAF

Para estudiar las consecuencias funcionales de los alelos de resistencia C-RAF identificados, se introdujeron las mutaciones representativas (Fig. 1A) en células de melanoma A375 y se expresaron en ellas. El análisis bioquímico seguido del tratamiento con inhibidor de Raf, PLX4720, atenuó la fosforilación de Mek (pMek) y la fosforilación de Erk (pErk) a una concentración de 2 μ M (Fig. 2A) en células A375 y células que expresaban C-RAF de tipo silvestre. Sin embargo, los alelos de resistencia mostraron pMek y pErk sostenidas a la misma concentración (Fig. 2A). Además, los alelos de resistencia agrupados hacia la región de unión a 14-3-3 (S257P y P261T) y uno en la región de unión a ATP, en particular, G361A, confirieron una potente resistencia farmacológica a PLX4720. Estos mutantes aumentaron los valores de IC₅₀ de PLX4720 en ~100 veces (S257P y P261T) y 30 veces (G361A) en comparación con el WT (0,4 μ M) (Fig. 2C). Además, la estabilidad de C-Raf se ha correlacionado con la fosforilación de S259 y S621 (Fig. 1C) y la posterior unión a 14-3-3, y la activación de C-RAF se ha correlacionado con la fosforilación de los restos S338 y S621 (Fig. 1C) (Wellbrock *et al.*, *Id.* 2004). PLX4720 indujo la fosforilación de S338 y un aumento modesto de S621, en particular, en mutantes de resistencia S257P, P261T y G361A, lo que coincide con la activación paradójica de pMek en estas variantes (Fig. 2B). Esta activación de C-RAF de la señalización de MEK/ERK fue suprimida por la inhibición farmacológica de MEK (Fig. 2G). Las células que expresaron WT presentaron un aumento modesto en S338, pero no en S621. Por el contrario, el sitio S259 se fosforiló en condiciones basales, y la expresión ectópica de C-RAF WT agravó el efecto en ausencia de PLX4720 (Fig. 2B). Sin embargo, PLX4720 también indujo la fosforilación de S259 en los mutantes de resistencia, pero comparativamente estos mutantes presentaron niveles de fosforilación de S259 inferiores (Fig. 2B), pero este efecto se atenuó en presencia de AZD6244 con niveles decrecientes de pErk (Fig. 2E). Como C-RAF se modula y activa a un alto nivel por fosforilación, estos datos sugieren que hay un bucle de activación e inhibición de retroalimentación que funciona de manera constante manteniendo la robustez y la rigurosidad de la salida de señalización de MAPK. Por lo tanto, la actividad del alelo de resistencia C-RAF se podría modular mediante un equilibrio entre la cantidad de fosforilación alcanzada por los sitios que generan actividad (S338, S621) y sitios que producen inhibición (S259). Solo un alelo (G361A) confirió evidencia de resistencia farmacológica a la inhibición de MEK (Fig. 2F y 2G).

Ejemplo 3: Los mutantes de resistencia C-RAF muestran un aumento de la asociación con B-RAF

Los datos acumulados anteriores muestran que los alelos de resistencia que abarcan el sitio de unión consenso a 14-3-3 (S257P y P261T) y la región de unión a ATP (G361A) (Fig. 1C) confieren resistencia debido a la reducción de la inhibición de MEK y ERK fosforiladas. Además, se ha demostrado que un doble mutante de S259/S621A anula por completo la interacción entre C-RAF y 14-3-3 sin afectar a la interacción con RAS o MEK (Tzivion *et al.*, *Nature* 394: 88-92, 1998). Para investigar el mecanismo subyacente, se inmunoprecipitó C-RAF a partir de células 293/T expresando ectópicamente todos los alelos de resistencia identificados durante la selección inicial. Las mutaciones que disminuyeron la interacción con 14-3-3 y aumentaron la interacción con B-RAF mantuvieron un estado de fosforilación de MEK y ERK mayor en comparación con el tipo silvestre (Fig. 3A) y también aumentaron la actividad C-RAF quinasa *in vitro* (datos no mostrados). Estos resultados corroboraron el estado de interacción de 14-3-3 y B-RAF en células A375 que expresaban alelos C-RAF (Fig. 3B). Por lo tanto, estos mutantes de resistencia poseen una mayor actividad hacia su sustrato incluso en ausencia de un conductor oncogénico tal como Ras (Weber *et al.*, 2001).

Ejemplo 4: Caracterización bioquímica de los alelos de resistencia C-RAF usando (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1*H*-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato

Para excluir la posibilidad de una unión ineficaz de PLX4720 a los mutantes de resistencia, Se examinaron las respuestas de C-RAF mutantes a (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1*H*-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-ilcarbamato (Novartis), en células A375 y células que expresaban C-RAF de tipo silvestre (Fig. 3C). Los alelos de resistencia C-RAF (S257P, P261T) aumentaron los valores de IC₅₀ de (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1*H*-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato en ~ 10,000 y ~30,000 veces respectivamente, y de G361A en 20 veces (Fig. 3C). Como se observa en las Fig. 2C y E, la respuesta a PLX4720 y AZD6244 permaneció invariable (Fig. 3B y D). Además, bioquímicamente, los mutantes de resistencia C-RAF confirieron resistencia a (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metilsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1*H*-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato incluso a una concentración de 1 μ M (Fig 3A).

Ejemplo 5: Los mutantes de resistencia C-RAF confieren resistencia a Vemurafenib (PLX4032).

Vemurafenib es altamente sensible a las mutaciones BRAF^{V600E}, pero causa una activación paradójica de Mek y Erk en células que expresan Ras oncogénica (Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Heidorn *et al.*, 2010; Poulikakos *et al.*, 2010). Se analizaron los alelos de resistencia C-RAF para determinar si presentaban una respuesta similar hacia Vemurafenib en presencia de B-RAF oncogénica. Las células A375 que expresaban C-RAF de tipo silvestre (0,4 μ M) (Fig. 5A) mostraron valores de IC₅₀ comparables a los de las células que expresaban C-RAF de tipo silvestre tratadas con PLX4720 (Fig. 2C). La resistencia conferida por G361A fue 50 veces mayor que la de WT, mientras

que, sorprendentemente, S257P y la P261T mostraron un aumento de la resistencia hacia Vemurafenib. Dado que estos mutantes confieren resistencia incluso en ausencia de Ras oncogénica, se determinó, además, si la resistencia al inhibidor de Raf se debió a un aumento de la actividad. Se inmunoprecipitó la C-RAF total de extractos de células A375 que expresaban las variantes de C-RAF en presencia y ausencia de Vemurafenib. Las mutaciones que mostraron alta resistencia (S257P y P261T) durante la inhibición farmacológica (Fig. 5A) tuvieron un aumento de la actividad quinasa *in vitro* en comparación con el tipo silvestre (Fig. 5B); sin embargo, el mutante de resistencia G361A presentó una actividad quinasa incluso mayor en presencia del fármaco (Fig. 5B). Además, se demuestra que los alelos de resistencia C-RAF permanecen sensibles al tratamiento combinatorio con PLX4720 y AZD6244 (Fig. 5C, D y E).

Conjuntamente, estos datos coinciden con la noción de que solo se requiere una cantidad óptima de señalización de Erk para que las células confieran resistencia.

Ejemplo 6: Los alelos de resistencia C-RAF permiten la activación paradójica de C-RAF y la dimerización potenciada

La activación paradójica de MEK/ERK inducida por inhibidores de RAF implica la dimerización de proteínas RAF (Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Poulikakos *et al.*, 2010). Además, una forma truncada de BRAF^{V600E} que muestra una dimerización potenciada confiere resistencia a los inhibidores de RAF (Poulikakos *et al.*, 2011). Para determinar si las mutaciones de resistencia C-RAF median en la resistencia a través del aumento de la dimerización, se realizaron transfecciones conjuntas en células 293/T usando construcciones de expresión en las que se marcaron diferencialmente varios alelos de resistencia C-RAF representativos con dos epítopos distintos (His/V5 o Flag). Se llevaron a cabo reacciones de inmunoprecipitación usando perlas de Ni²⁺ (para capturar la proteína marcada con His), seguidas de inmunotransferencia usando anticuerpo anti-Flag. En estos experimentos, todas las mutaciones C-RAF que confieren resistencia farmacológica a inhibidores de RAF también presentaron un aumento de la homodimerización en comparación con C-RAF de tipo silvestre (S257P, P261T, G361A y E478K). Como era de esperar, en general, el aumento de dimerización se correlacionó con niveles aumentados de p-MEK (Fig. 6A, lisado de entrada). Se observaron resultados similares cuando se transfecaron conjuntamente mutantes C-RAF marcados con His/V5 con C-RAF de tipo silvestre marcada con Flag (Fig. 10A), aunque la magnitud de la activación de MEK/ERK pareció cualitativamente reducida (Fig. 10A, lisado de entrada). Los tres mutantes C-RAF que confieren la resistencia farmacológica más potente hacia PLX4720 y vemurafenib (S257P, P261T y G361A) (Fig. 2C y 2F) también mostraron pruebas de una mayor acumulación de proteína total (Fig. 6A, lisado de entrada). Así pues, el fenotipo de resistencia vinculado a las mutaciones C-RAF se correlacionó estrechamente con la dimerización de RAF.

En las células 293T (que carecen de mutaciones BRAF oncogénicas), se mantuvo el aumento de la dimerización de C-RAF engendrado por la presencia de mutaciones de resistencia, pero no se potenció más tras la exposición de las células transfecadas al inhibidor de RAF (vemurafenib; Fig. 6B). Sin embargo, tanto la activación de C-RAF (evidenciada por la fosforilación de S338) como la señalización de MEK/ERK cadena abajo fueron inducidas potientemente por el inhibidor de RAF (Fig. 6B, lisado de entrada). Para determinar los efectos de estas mutaciones de resistencia sobre la actividad C-RAF quinasa intrínseca, se realizaron reacciones de quinasa *in vitro* a partir de células 293T cultivadas en presencia o ausencia de inhibidor de RAF. En ausencia de fármaco, en la mayoría de los casos, no se aumentó de forma medible la actividad C-RAF quinasa en estado estacionario (p-MEK) mediante las mutaciones de resistencia (Fig. 6C). CRAFG^{G361A} fue la excepción a esto; en este caso, se detectó una modesta actividad quinasa en estado estacionario, que se correlacionó con niveles potentes de p-MEK intrínseca en los lisados celulares completos correspondientes (Fig. 6C). En contraste, el tratamiento de células 293T con vemurafenib a 2 μM antes de los ensayos de quinasa *in vitro* produjo una notable regulación positiva de la actividad C-RAF quinasa en todos los alelos de resistencia examinados (Fig. 6C). Experimentos similares en células de melanoma BRAF^{V600E} (A375) revelaron un aumento de la actividad quinasa intrínseca en los tres mutantes de resistencia C-RAF más potentes examinados (S257P, P261T y G361A; Fig. 6D). Esta actividad quinasa se aumentó más con la exposición de estas células a vemurafenib (Fig. 6D), como se observó en las células 293T. En conjunto, estos resultados sugirieron que los potentes mutantes de resistencia C-RAF potenciaron tanto la dimerización de RAF como la actividad C-RAF quinasa mediada por el inhibidor de RAF.

Ejemplo 7: Los mutantes de resistencia C-RAF presentan una unión a 14-3-3 reducida y una mayor heterodimerización de B-RAF

Los datos acumulados anteriores sugieren que las mutaciones C-RAF que engloban su sitio de unión a 14-3-3 consenso (S257P y P261T) y la región de unión a ATP del bucle P (G361A) confirieron resistencia farmacológica y bioquímica hacia la inhibición de RAF, la dimerización potenciada de RAF y el aumento de la activación de C-RAF quinasa tras el tratamiento con inhibidores de RAF. Para investigar el papel de la unión de la proteína 14-3-3 en relación con la dimerización de RAF, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación a partir de células diseñadas para expresar ectópicamente alelos de resistencia C-RAF. Para examinar los efectos de la inhibición farmacológica de RAF sobre la unión a 14-3-3 y la heterodimerización de B-RAF, estos experimentos se realizaron tanto en ausencia como en presencia de inhibición de RAF (en este caso, vemurafenib). En ausencia de inhibidor de RAF, los alelos de resistencia C-RAF S257P, P261T y G361A tendieron a demostrar interacciones reducidas con 14-3-3 ζ, y aumentaron las interacciones con B-RAF tanto en células 293T (Fig. 7A) como, en particular, células de melanoma A375 (BRAF^{V600E}) (Fig. 7B). En las células 293T, la heterodimerización potenciada de C-RAF/B-RAF

desencadenada por las mutaciones C-RAF se correlacionó con la estabilización de la proteína C-RAF y la potente fosforilación de MEK/ERK (Fig. 7A). Por otro lado, la potente activación de MEK/ERK observada en las células de melanoma BRAF^{V600E} solo fue potenciada marginalmente por los mutantes de resistencia C-RAF (Fig. 7B); este resultado era de esperar, dada la señalización oncogénica constitutiva de B-RAF en estas células. Curiosamente, uno de los mutantes C-RAF (G356E) mostró una unión a 14-3-3 ζ muy baja en ambos contextos celulares (Fig. 7A y 7B); sin embargo, C-RAF^{G356E} no mostró enriquecimiento en la heterodimerización de B-RAF ni aumento en la señalización de MEK/ERK en condiciones de estado estacionario. Estos resultados sugieren que aunque la unión a 14-3-3 reducida puede promover la dimerización de C-RAF mutante potenciada, se requiere un cierto grado de unión a 14-3-3 (tal vez dentro del dominio C-terminal) para promover la máxima señalización dependiente de RAF.

Como era de esperar, el inhibidor de RAF vemurafenib indujo la heterodimerización de B-RAF/C-RAF en células 293/T de manera ectópica expresando C-RAF de tipo silvestre (Fig. 7A), pero abrogó esta heterodimerización en las células de melanoma A375 (Fig. 7B). En contraste, la expresión ectópica de los mutantes de resistencia C-RAF más potentes permitió la heterodimerización de B-RAF sostenida, incluso en presencia de fármaco en las células A375 (Fig. 7B). Estos resultados sugieren que BRAF^{V600E} adopta una configuración dominante que favorece la heterodimerización con variantes de C-RAF asociadas a la resistencia. La inhibición farmacológica de RAF tuvo efectos variables sobre la interacción de 14-3-3/C-RAF dependiendo del contexto genético celular. En las células A375 (BRAF^{V600E}), vemurafenib disminuyó modestamente la unión de 14-3-3 ζ a C-RAF de tipo silvestre, pero no tuvo efecto en la fijación de los mutantes C-RAF^{S257P}, C-RAF^{P261T} y C-RAF^{G361A} (Fig. 7B). Por otro lado, el vemurafenib mejoró estas interacciones de 14-3-3/C-RAF en las células 293/T (Fig. 7A). Estos hallazgos respaldaron la premisa de que el fenotipo de resistencia conferido por estos mutantes C-RAF en el contexto de BRAF^{V600E} implicaba una dimerización de RAF potenciada, que se correlacionaba con una disminución de las interacciones de 14-3-3/C-RAF.

Ejemplo 8: La señalización potenciada de MEK/ERK por parte de los mutantes de resistencia C-RAF requiere la dimerización

Para probar si la dimerización de C-RAF es necesaria para la señalización de MEK/ERK potenciada conferida por mutantes de resistencia C-RAF, se introdujo una mutación de arginina-histidina en el resto R401 (C-RAF^{R401H}) (Fig. 10B). Se ha demostrado previamente que este mutante interrumpe la homodimerización de C-RAF ((Hatzivassiliou *et al.*, *Nature* 464: 431-435, 2010; Poulikakos *et al.*, *Nature* 464:427-430, 2010)). Se introdujo la mutación deficiente en dimerización R401H en los respectivos alelos de resistencia C-RAF. Como era de esperar, los mutantes dobles C-RAF se volvieron en gran parte incapaces de una señalización potenciada de MEK/ERK (Fig. 8A). A continuación, se realizaron transfecciones conjuntas usando mutantes dobles de R401H/C-RAF marcados diferencialmente con epítopo. Como se ha descrito anteriormente, los alelos de resistencia C-RAF aumentaron la homodimerización de C-RAF de una manera no afectada por el inhibidor de RAF (Fig. 8B). En contraste, la introducción del alelo R401H suprimió la homodimerización de C-RAF e inhibió la señalización de MEK/ERK en la mayoría de los contextos mutantes de C-RAF examinados. La excepción a esto fue el alelo C-RAF^{G361A}, que presentó activación constitutiva (aunque notablemente reducida) de MEK/ERK, que fue inducida además por la exposición a vemurafenib, incluso cuando se expresó junto con el doble mutante deficiente en dimerización. Junto con los resultados de la actividad quinasa *in vitro* anteriores, estos datos sugieren que el alelo C-RAF^{G361A/R401H} también puede contener una mayor actividad quinasa intrínseca. En su conjunto, estos resultados proporcionan la evidencia directa de que la señalización potenciada de MEK/ERK conferida por los mutantes de resistencia C-RAF requiere la dimerización de RAF. También pueden proporcionar una justificación para el desarrollo futuro de inhibidores alostéricos de RAF que interrumpan la superficie de contacto de dimerización de RAF.

45 Métodos

Cultivo celular

50 Se cultivaron células 293/T, células A375 (ATCC) y células Phoenix (alelo Biotech), y se mantuvieron a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10 % en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %.

55 Selección mediante mutagénesis aleatoria de C-RAF

Se clonó ADNc de C-RAF en el vector pWZL-Blast (obsequio de J. Boehm y W. C. Hahn) mediante clonación de recombinación (Invitrogen). Se introdujeron mutaciones específicas en el ADNc de c-raf usando la mutagénesis dirigida QuickChange II (Stratagene). La mutagénesis aleatoria se realizó basándose en el protocolo establecido (Emery *et al.*, *Id.* 2009). El plásmido de C-RAF mutagenizado se usó para infectar células de melanoma A375. Tras la selección con blasticidina, se sembraron las células en placas de 15 cm y se cultivaron en presencia de inhibidor de RAF, PLX4720 (1,5 μM) durante 4 semanas hasta que surgieron los clones resistentes.

Secuenciación de ADN de c-RAF

65 Se agruparon las células resistentes a PLX4720 surgidas de la selección por mutagénesis aleatoria, y se preparó ADN genómico (Qiagen DNeasy). Se amplificó ADNc de C-RAF a partir de ADN genómico usando cebadores

específicos para la secuencia del vector de flanqueo en el extremo 5' y 3', y se secuenció mediante el método de Sanger usando protocolos establecidos.

5 Análisis de secuenciación masiva paralela

10 Se analizaron los datos sin procesar de los carriles de secuenciación masiva paralela (Illumina, 2-3 millones de secuencias de 36 pares de bases por carril) usando un canal de análisis de secuenciación de "próxima generación" (Emery *et al.*, PNAS, 2009). Se integraron y se procesaron los resultados de los archivos de datos que representan la secuencia de nucleótidos, la medida de calidad por base, las variantes detectadas y la alineación con la secuencia de referencia de ADNc (según lo determinado mediante la alineación con el algoritmo ELAND) para cada serie. Se determinó la cobertura (es decir, el número de fragmentos que incluyen cada base de la referencia de ADNc) para todas las bases, y se cartografiaron las variantes alélicas a partir de fragmentos de ADN individuales en la secuencia de referencia. Se determinó la frecuencia de variación para cada alelo de tipo no silvestre, y se calculó una puntuación media de variante (AVS) como la media de todas las puntuaciones de calidad para la posición y la variante alélica en cuestión. Se tradujeron todas las mutaciones de codificación para determinar la variación de aminoácidos (si existe), y se cargaron los datos para las mutaciones de alta frecuencia ($> 0,5\%$) y de alta calidad (AVS >7) en la base de datos de resultados de CCGD.

20 Infecciones retrovíricas

25 Se transfectaron células Phoenix (70 % de confluencia) con pWZLBlast-C-RAF o los mutantes usando Fugene 6 (Roche). Se pasaron los sobrenadantes que contenían el virus a través de una jeringa de 0,45 μm . Se infectaron las células A375 durante 16 h con virus junto con polibreno (4 $\mu\text{g/ml}$, Sigma). Se introdujo el marcador selectivo blasticidina (3 $\mu\text{g/ml}$) 48 h después de la infección.

30 Análisis de transferencia Western

35 Se extrajeron muestras tras lavar dos veces con PBS y se lisaron con NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, PMSF, fluoruro sódico, ortovanadato de sodio y cóctel inhibidor de proteasa en presencia de NP-40 al 1 %. Se estimó el contenido de proteína con reactivo de ensayo de proteínas (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cargaron cantidades iguales de lisados de células enteras y se separaron mediante geles listos para usar de SDS-PAGE al 8-16 %. Se transfirieron las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno en un aparato Trans-Blot. Se bloquearon las membranas con leche desnatada al 5 % en TBS que contenía Tween 20 al 0,1 % durante 1 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. Luego, se incubaron las membranas con anticuerpo monoclonal o policlonal producido contra la proteína de interés durante 1 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C, seguido de tres lavados con TBS que contenía Tween 20 al 0,1 %. Se visualizó la inmunorreactividad de los anticuerpos primarios C-RAF, S259C-RAF, S338C-RAF, S621C-RAF, pERK, ERK, pMEK, MEK, 14-3-3 ζ Flag (Cell Signaling), B-RAF (Santa Cruz Biotechnology) y actina (Sigma) con anticuerpos anti-conejo (BD Transduction Laboratories) o anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology) secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante y el posterior desarrollo con ECL Plus (Amersham Biosciences) y autorradiografía en películas X-OMAR TAR. Se rastrearon las bandas y se cuantificaron mediante el sistema Gel Doc usando el software Quantity One.

40 Inmunoprecipitación

45 Para la inmunoprecipitación con anticuerpo C-RAF (BD Biosciences), se lavó suspensión de proteína G-Sefarosa (Thermo Scientific) con 1 x PBS y se incubó con anticuerpo C-RAF (BD Biosciences) o IgG de ratón normal (control) durante 1 h a 4 °C. Tras tres lavados con tampón de lisis, se incubaron las perlas con lisados celulares completos (0,5 mg de proteína total) durante 2 h, y luego se lavaron tres veces con tampón de lisis. Despues, se eluyeron las proteínas hirviendo en 1 x tampón de muestra SDS.

50 Ensayo de C-RAF quinasa

55 Se transfectaron células 293T (70 % de confluencia) con 6 μg de pc-ADN con marcador de His o de V5 hacia el extremo C que contenía C-RAF-WT y variantes alélicas de C-RAF. Se trataron las células con vemurafenib (Allele Biotech) durante 1 h y, 48 h después de la transfección, se extrajeron los lisados mediante el protocolo general. Se realizó la inmunoprecipitación usando perlas de cobalto durante la noche durante 1 h a 4 °C. Se incubaron las perlas de cobalto unidas a proteína con 20 μl de mezcla de ATP/magnesio (Mops 20 mM, pH 7,2, β -gliceroftosfato 25 mM, EGTA 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 75 mM, y ATP 0,5 mM), 20 μl de tampón de dilución (Mops 20 mM, pH 7,2, fosfato de glicerol 25 mM, EGTA 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, DTT 1 mM), y 1 μg de MEK inactiva (obtenida en Millipore) durante 30 minutos a 30 °C. El producto de MEK fosforilada se detectó por inmunotinción usando un anticuerpo p-MEK (Cell Signaling Technology), y las señales relativas de p-MEK se cuantificaron usando densitometría, se normalizaron con respecto a la cantidad de C-RAF de entrada, y se compararon con C-RAF-WT como referencia.

Ensayo de C-RAF quinasa (A375)

Se cultivaron células A375 infectadas con WT y alelos de C-RAF mutantes en ausencia y presencia de PLX4032 (Allele Biotech) durante 16 h. Se prepararon lisados con NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, PMSF, fluoruro sódico, ortovanadato de sodio y cóctel inhibidor de proteasa en presencia de NP-40 al 1 %. Se realizó la inmunoprecipitación con anticuerpo C-RAF durante una noche, y las perlas unidas se lavaron tres veces con tampón de lisis, seguido de tampón de quinasa (x 1). Se incubaron las perlas con 20 ul de mezcla de ATP/magnesio (Millipore) y 0,5 µg de MEK inactiva (Millipore) durante 30 min a 30 °C. El sustrato MEK fosforilado se detectó mediante inmunotransferencia.

10 Ensayos de inhibición del crecimiento farmacológico

Se sembraron células cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3.000 células por pocillo para todos los cultivos de melanoma a corto plazo, incluyendo A375. Después de 16 h, se realizaron diluciones en serie del compuesto en DMSO, y se transfirieron a las células para producir concentraciones de fármaco basadas en la potencia del fármaco, asegurándose de que el volumen final de DMSO no superara el 1 %. El inhibidor de B-RAF PLX4720 (adquirido en Symansis), PLX4032 (adquirido en Allele Biotech), AZD6244 (adquirido en Selleck Chemicals) y GSK1120212 (adquirido en Active Biochem). Tras la adición del fármaco, se midió la viabilidad celular usando el ensayo de proliferación no radioactivo acuoso Cell-Titer-96 (Promega) después de 4 días. Se calculó la viabilidad como un porcentaje del control (células sin tratar) tras restar el fondo. Se realizó un mínimo de seis réplicas para cada estirpe celular, y el experimento completo se repitió al menos tres veces. Los datos de los ensayos de inhibición del crecimiento farmacológico se modelizaron usando un ajuste de curva de regresión no lineal con una dosis-respuesta sigmoidal. Estas curvas se visualizaron usando GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad). Los valores de IC₅₀ se calcularon determinando la pendiente de la línea que conectaba los puntos de datos que flanqueaban el punto del 50 %.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Emery, Caroline
 Antony, Rajee
 Garraway, Levi A.
 10 <120> MUTANTES C-RAF QUE CONFIEREN RESISTENCIA A LOS INHIBIDORES DE RAF
 15 <130> 14293-182
 20 <150> US 61/616.999
 <151> 28-03-2012
 25 <150> US 61/708.372
 <151> 01-10-2012
 30 <160>2
 35 <170> PatentIn versión 3.5
 40 <210> 1
 <211> 3216
 <212> ADN
 <213> Humano
 45 <400> 1
 50 tcgcgggcgc ttgggcccgc atcttagatg gcggggagtaa gagaaaaacg attgtgaggc 60
 55 gggaacggct ttctgctgcc ttttttggc cccgaaaagg gtcagctggc cgggctttgg 120
 60 ggcgctgtgcc ctgaggcgcg gagcgcgttt gctacgatgc gggggctgct cggggctccg 180
 65 tccccctggc tggggacgcg ccgaatgtga ccgcctcccg ctccctcacc cgccgcgggg 240
 70 aggaggagcg ggcgagaagc tgccgcccga cgacaggacg ttggggcggc ctggctccct 300
 75 caggttaag aattgtttaa gctgcatcaa tggagcacat acagggagct tggaaagacga 360
 80 tcagcaatgg ttttgattc aaagatgccg tggttgatgg ctccagctgc atctctccta 420
 85 caatagttca gcagtttggc tatcagcgcc gggcatcaga tggatggcaaa ctcacagatc 480
 90 cttctaagac aagcaacact atccgtgtt tcttgcggaa caagcaaaga acagtggtca 540
 95 atgtgcgaaa tggaaatgagc ttgcattgact gccttatgaa agcactcaag gtgagggggcc 600
 100 tgcaaccaga gtgctgtgca gtgttcagac ttctccacga acacaaaggt aaaaaagcac 660
 105 gcttagattg gaataactgat gctgcgtctt tgattggaga agaacttcaa gtagatttcc 720
 110 tggatcatgt tcccctcaca acacacaact ttgctcgaa gacgttcctg aagcttgcct 780
 115 tctgtgacat ctgtcagaaa ttcctgctca atggatttcg atgtcagact tgtggctaca 840
 120 aatttcatga gcactgttagc accaaagtac ctactatgtg tgtggactgg agtaacatca 900
 125 gacaactctt attgtttcca aattccacta ttgggtgatag tggagtccta gcactacctt 960
 130 ctttgactat gcgtcgtatg cgagagtctg tttccaggat gcctgttagt tctcagcaca 1020
 135 gatattctac acctcacgcc ttcaccttta acacctccag tccctcatct gaaggttccc 1080
 140 tctccagag gcagaggtcg acatccacac ctaatgtcca catggtcagc accaccctgc 1140

ctgtggacag caggatgatt gaggatcaa ttcaagtca cagcgaatca gcctcacctt	1200
cagccctgtc cagtagcccc aacaatctga gccaacagg ctggtcacag ccgaaaaccc	1260
ccgtgccagc acaaagagag cgggcaccag tatctggac ccaggagaaa aacaaaatta	1320
ggectcggtt acagagagat tcaagctatt attggaaat agaagccagt gaagtgtgc	1380
tgtccactcg gattgggtca ggctctttg gaactgttta taaggtaaa tggcacggag	1440
atgttcagt aaagatccta aaggttgtcg acccaacccc agagcaattc caggccttca	1500
ggaatgaggt ggctgttctg cgcaaaacac ggcattgtgaa cattctgctt ttcatgggt	1560
acatgacaaa ggacaacctg gcaattgtga cccagtggc cgagggcagc agcctctaca	1620
aacacctgca tgtccaggag accaagttc agatgttcca gctaattgac attgcccggc	1680
agacggctca ggaatggac tatttgcattt caaagaacat catccataga gacatgaaat	1740
ccaacaatat atttctccat gaaggctaa cagtgaaaat tggagattt gtttggcaa	1800
cagtaaagtc acgctggagt ggttctcagc aggttgaaca acctactggc tctgtcctct	1860
ggatggcccc agaggtgatc cgaatgcagg ataacaaccc attcagttt cagtcggatg	1920
tctactccta tggcatcgta ttgtatgaac tgatgacggg ggagcttcct tattctcaca	1980
tcaacaaccc agatcagatc atcttcatttgg tggccgagg atatgcctcc ccagatctta	2040
gtaagctata taagaactgc cccaaagcaa tgaagaggct ggtagctgac tgtgtgaaga	2100
aagtaaagga agagaggcct cttttcccc agatcctgtc ttccattttag ctgctccaac	2160
actctctacc gaagatcaac cggagcgctt ccgagccatc cttgcattcg gcagccccaca	2220
ctgaggatataatgcatttgc acgctgacca cgtccccgag gctgcctgtc ttctagttga	2280
ctttgcacct gtcttcaggc tgccagggga ggaggagaag ccagcaggca ccactttct	2340
gctcccttc tccagaggca gaacacatgt tttcagagaa gctgcgtcta aggaccttct	2400
agactgctca cagggcctta acttcattttt gccttctttt ctatcccttt gggccctggg	2460
agaaggaagc catttgcaatgt gctgggtgtt cctgcctccct ccccacattc cccatgctca	2520
aggcccagcc ttctgttagat ggcgaagtgg atgttgcattttt tagtacaaaa agcagggggcc	2580
cagccccagc tggggctac atgatgtttt agaggaagta aggtgcagg cagtcggc	2640
ctgatgtgga gacacatggg atttggaaa tcagcttctg gaggaatgca tgtcacaggc	2700
gggactttct tcagagatgt gtgcagcgcc agacattttt cacataaggc accaaacagc	2760
ccaggactgc cgagactctg gccgccccaa ggagcctgtt ttggtaactat ggaactttt	2820
ttagggaca cgtcccttc ttccatgttc taagggtgtcc agtgcattgg gatggtttc	2880
caggcaaggc actcggccaa tccgcatttc agccctctca gggagcagtc ttccatcatg	2940
ctgaatttttgc ttccatgttc gctgccccta tggggcgggg ccgcaggggcc agcatttttt	3000

ES 2 908 078 T3

ctctaacaaa caaacaaaca aacaggccttg tttctctagt cacatcatgt gtatacaagg	3060
aagccaggaa tacagggtttt cttgatgatt tgggttttaa ttttgtttt attgcacctg	3120
acaaaataca gttatctgat ggtccctcaa ttatgttatt ttaataaaat aaattaaatt	3180
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	3216

5 <210> 2
 <211> 648
 <212> PRT
 <213> Humano

10 <400> 2

Met Glu His Ile Gln Gly Ala Trp Lys Thr Ile Ser Asn Gly Phe Gly	
1 5 10 15	

Phe Lys Asp Ala Val Phe Asp Gly Ser Ser Cys Ile Ser Pro Thr Ile	
20 25 30	

Val Gln Gln Phe Gly Tyr Gln Arg Arg Ala Ser Asp Asp Gly Lys Leu	
35 40 45	

Thr Asp Pro Ser Lys Thr Ser Asn Thr Ile Arg Val Phe Leu Pro Asn	
50 55 60	

Lys Gln Arg Thr Val Val Asn Val Arg Asn Gly Met Ser Leu His Asp	
65 70 75 80	

Cys Leu Met Lys Ala Leu Lys Val Arg Gly Leu Gln Pro Glu Cys Cys	
85 90 95	

Ala Val Phe Arg Leu Leu His Glu His Lys Gly Lys Lys Ala Arg Leu	
100 105 110	

Asp Trp Asn Thr Asp Ala Ala Ser Leu Ile Gly Glu Glu Leu Gln Val	
115 120 125	

Asp Phe Leu Asp His Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Ala Arg Lys	
130 135 140	

Thr Phe Leu Lys Leu Ala Phe Cys Asp Ile Cys Gln Lys Phe Leu Leu	
145 150 155 160	

Asn Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Glu His Cys	
165 170 175	

Ser Thr Lys Val Pro Thr Met Cys Val Asp Trp Ser Asn Ile Arg Gln	
180 185 190	

ES 2 908 078 T3

Leu Leu Leu Phe Pro Asn Ser Thr Ile Gly Asp Ser Gly Val Pro Ala
195 200 205

Leu Pro Ser Leu Thr Met Arg Arg Met Arg Glu Ser Val Ser Arg Met
210 215 220

Pro Val Ser Ser Gln His Arg Tyr Ser Thr Pro His Ala Phe Thr Phe
225 230 235 240

Asn Thr Ser Ser Pro Ser Ser Glu Gly Ser Leu Ser Gln Arg Gln Arg
245 250 255

Ser Thr Ser Thr Pro Asn Val His Met Val Ser Thr Thr Leu Pro Val
260 265 270

Asp Ser Arg Met Ile Glu Asp Ala Ile Arg Ser His Ser Glu Ser Ala
275 280 285

Ser Pro Ser Ala Leu Ser Ser Ser Pro Asn Asn Leu Ser Pro Thr Gly
290 295 300

Trp Ser Gln Pro Lys Thr Pro Val Pro Ala Gln Arg Glu Arg Ala Pro
305 310 315 320

Val Ser Gly Thr Gln Glu Lys Asn Lys Ile Arg Pro Arg Gly Gln Arg
325 330 335

Asp Ser Ser Tyr Tyr Trp Glu Ile Glu Ala Ser Glu Val Met Leu Ser
340 345 350

Thr Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp
355 360 365

His Gly Asp Val Ala Val Lys Ile Leu Lys Val Val Asp Pro Thr Pro
370 375 380

Glu Gln Phe Gln Ala Phe Arg Asn Glu Val Ala Val Leu Arg Lys Thr
385 390 395 400

Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Met Thr Lys Asp Asn
405 410 415

Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr Lys His
420 425 430

Leu His Val Gln Glu Thr Lys Phe Gln Met Phe Gln Leu Ile Asp Ile
435 440 445

ES 2 908 078 T3

Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Asn Ile
450 455 460

Ile His Arg Asp Met Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Gly Leu
465 470 475 480

Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp
485 490 495

Ser Gly Ser Gln Gln Val Glu Gln Pro Thr Gly Ser Val Leu Trp Met
500 505 510

Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp Asn Asn Pro Phe Ser Phe Gln
515 520 525

Ser Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly
530 535 540

Glu Leu Pro Tyr Ser His Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met
545 550 555 560

Val Gly Arg Gly Tyr Ala Ser Pro Asp Leu Ser Lys Leu Tyr Lys Asn
565 570 575

Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Val Ala Asp Cys Val Lys Lys Val
580 585 590

Lys Glu Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ser Ser Ile Glu Leu
595 600 605

Leu Gln His Ser Leu Pro Lys Ile Asn Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser
610 615 620

Leu His Arg Ala Ala His Thr Glu Asp Ile Asn Ala Cys Thr Leu Thr
625 630 635 640

Thr Ser Pro Arg Leu Pro Val Phe
645

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de B-RAF para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, en el que se ha determinado que al menos una parte de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido C-RAF extraído de células de un cáncer del sujeto que comprende una o más mutaciones que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido C-RAF codificado en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre que comprende SEQ ID NO: 2 en una o más posiciones seleccionada del grupo que consiste en 104E>K, 257S>P, 261P>T, 356G>E, 361G>A, 427S>T, 447D>N, 469M>I, 478E>K y 554R>K en comparación con SEQ ID NO: 2; y en el que el inhibidor de RAF se administra con un segundo inhibidor; en el que el segundo inhibidor proporciona un ciclo de tratamiento en respuesta a la identificación de las mutaciones mencionadas anteriormente que indican una probable resistencia al inhibidor de B-RAF.

2. El inhibidor de B-RAF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el método:

15 (a) extraer ácido nucleico de células de un cáncer del paciente;

(b) ensayar al menos una parte de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido C-RAF para detectar la presencia de una o más mutaciones en una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido C-RAF que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido C-RAF codificado en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre que comprende SEQ ID NO: 2 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 104E>K, 257S>P, 261P>T, 356G>E, 361G>A, 427S>T, 447D>N, 469M>I, 478E>K y 554R>K en comparación con SEQ ID NO: 2; y

(c) administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de B-RAF y una cantidad eficaz de un segundo inhibidor al sujeto cuando la molécula de ácido nucleico incluye nucleótidos que alteran el resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido C-RAF codificado en comparación con un polipéptido C-RAF de tipo silvestre; en el que el segundo inhibidor proporciona un ciclo de tratamiento en respuesta a la identificación de las mutaciones mencionadas anteriormente que indican una probable resistencia al inhibidor de B-RAF.

30 3. El inhibidor de B-RAF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el segundo inhibidor es un inhibidor de MEK.

35 4. El inhibidor de B-RAF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el inhibidor de B-RAF se selecciona del grupo que consiste en RAF265, sorafenib, SB590885, PLX 4720, PLX4032, GDC-0879- y (S)-metil-1-(4-(3-(5-cloro-2-fluoro-3-(metsulfonamido)fenil)-1-isopropil-1*H*-pirazol-4-il)pirimidin-2-ilamino)propan-2-il-carbamato.

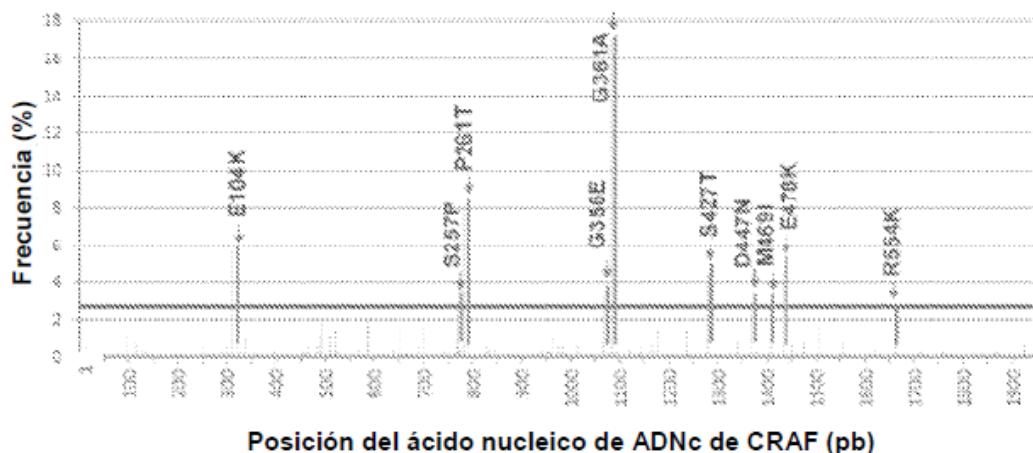
40 5. El inhibidor de B-RAF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que el inhibidor de MEK se selecciona del grupo que consiste en CI-1040/PD184352, AZD6244, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119, 6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-4-(4-fenoxy-fenilamino)-quinolin-3-carbonitrilo y 4-[3-cloro-4-(1-metil-1*H*-imidazol-2-ilsulfanil)-fenilamino]-6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinolin-3-carbonitrilo.

45 6. El inhibidor de B-RAF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de mama, cánceres colorrectales, glioma, cáncer pulmonar, cáncer ovárico, sarcoma y cáncer tiroideo.

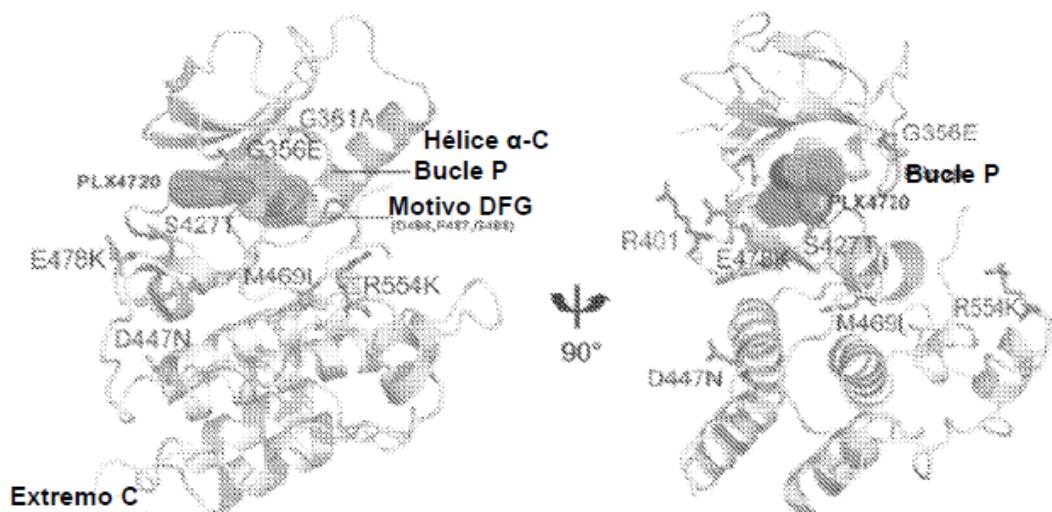
7. El inhibidor de B-RAF para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el cáncer es melanoma.

Figura 1

A



B



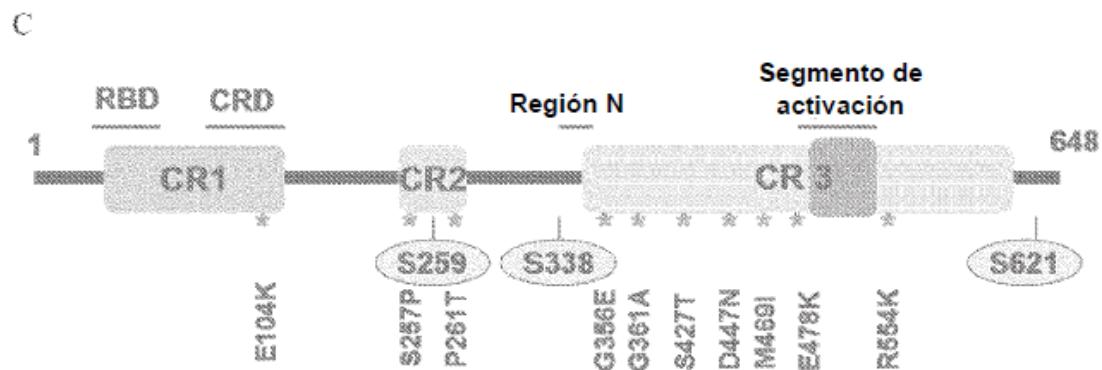
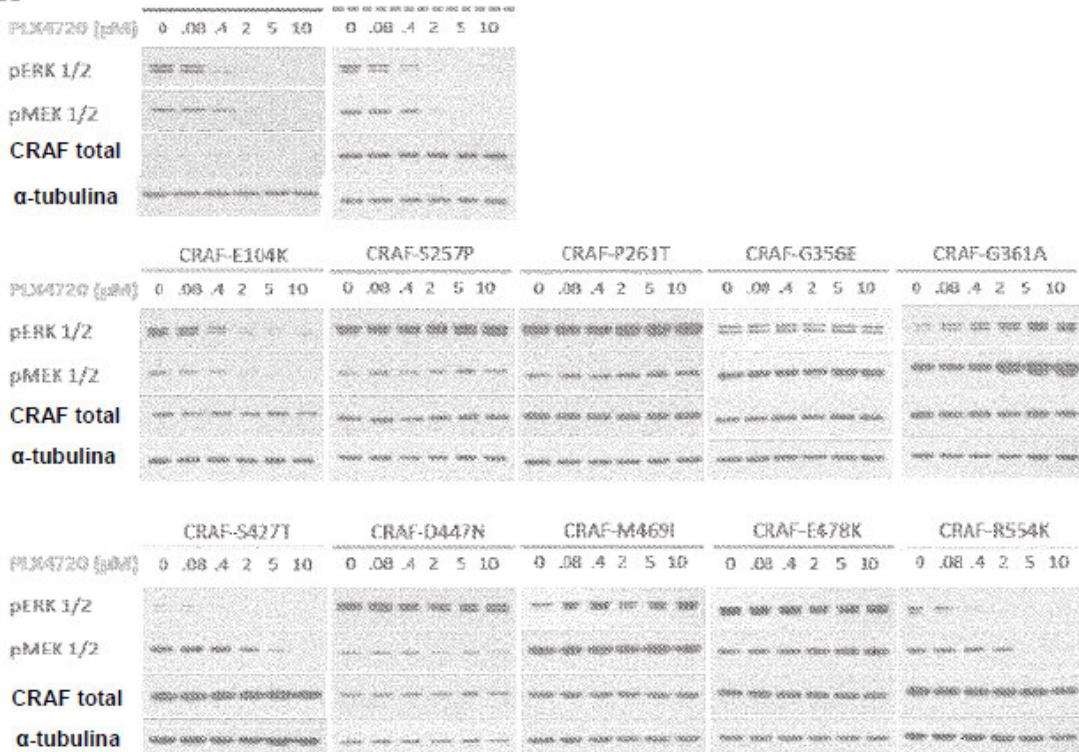
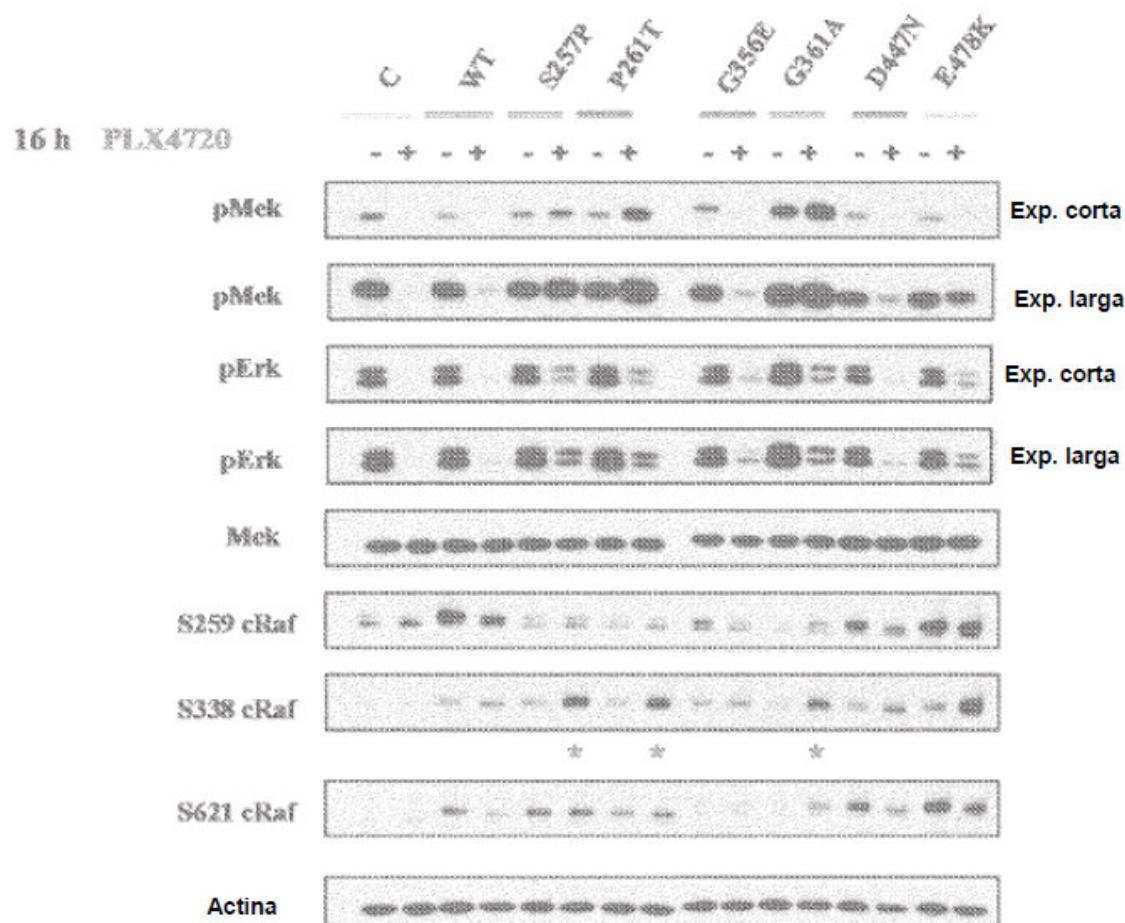


Figura 2**A**

B



C

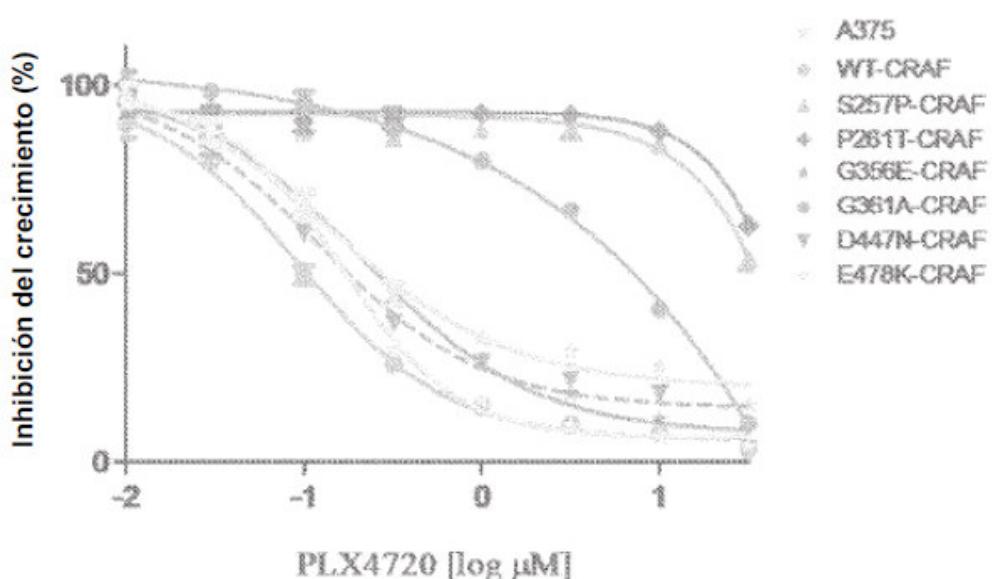


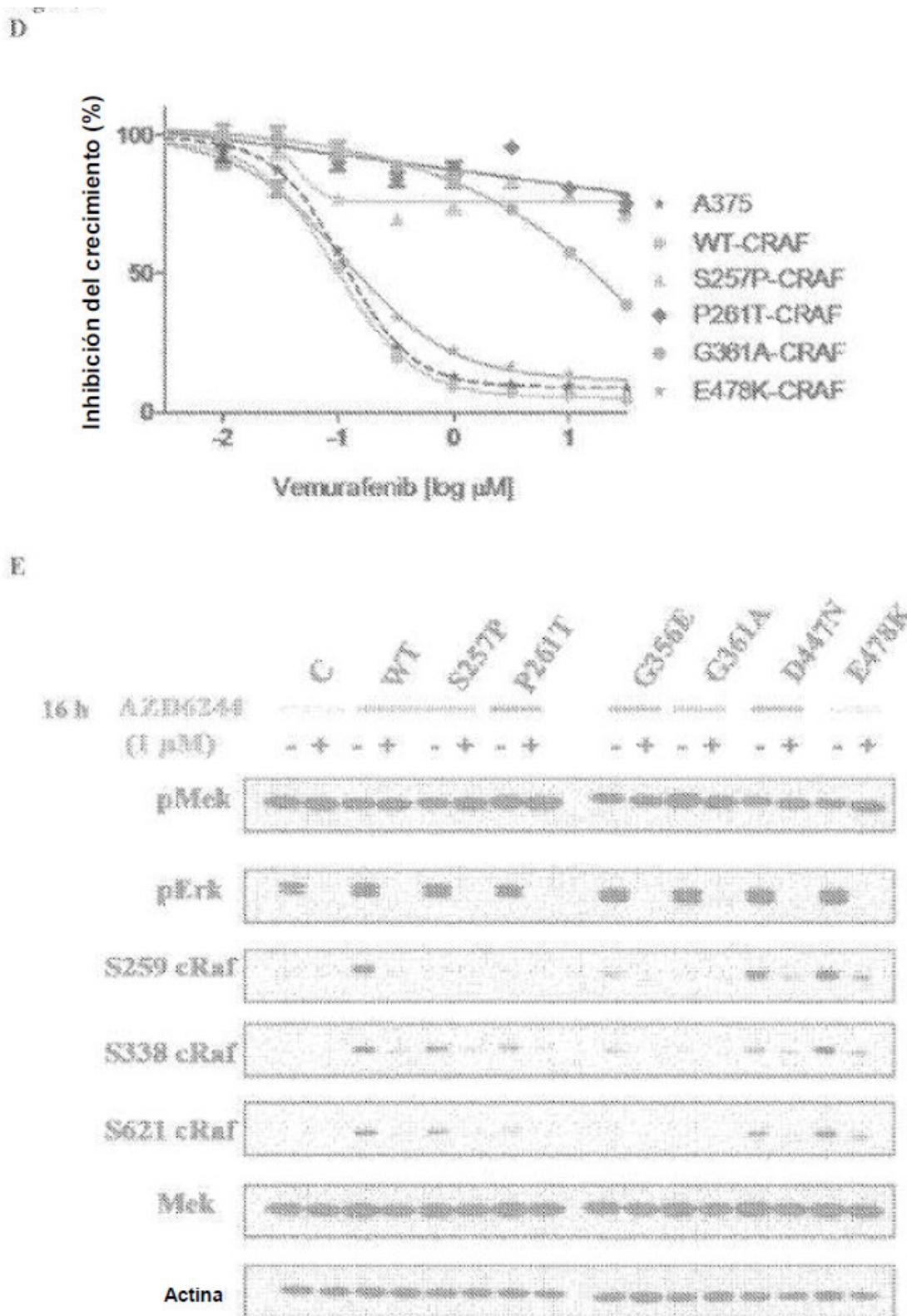
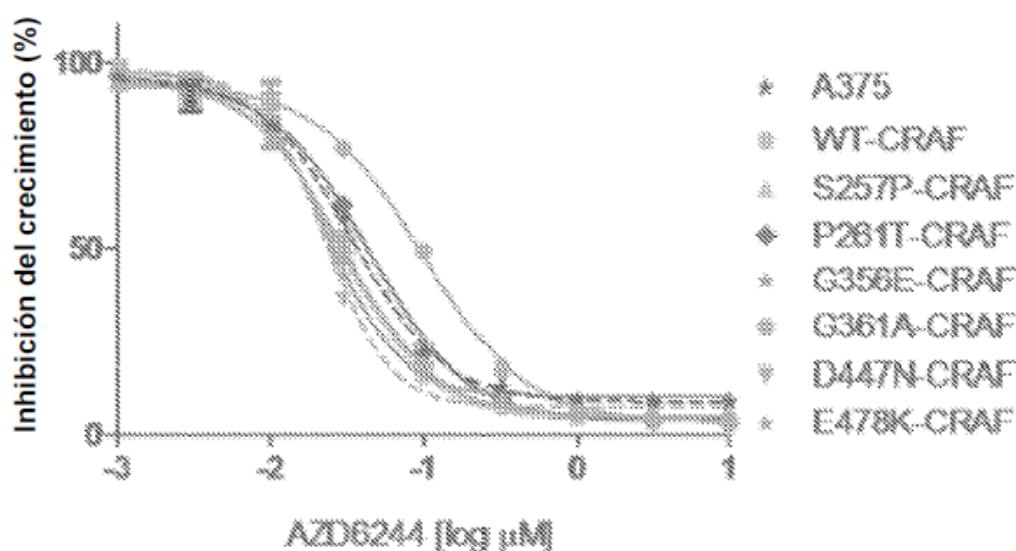
Figura 2

Figura 2

F



G

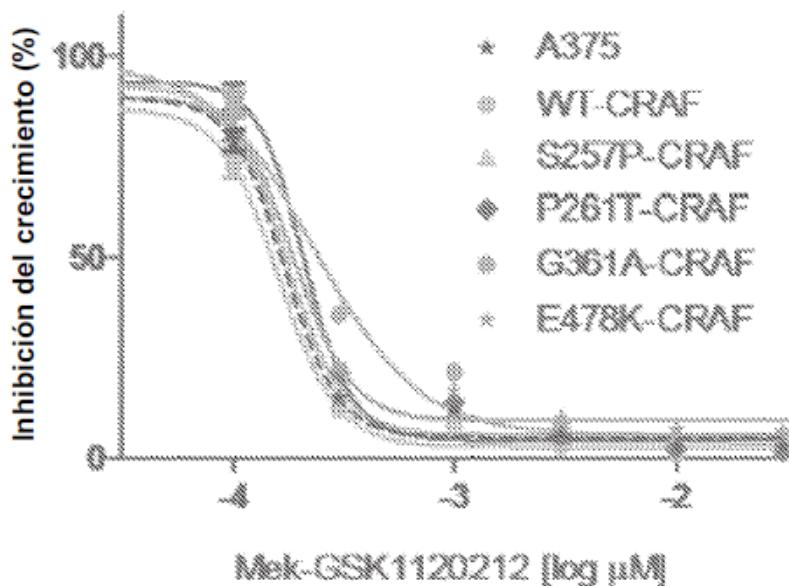


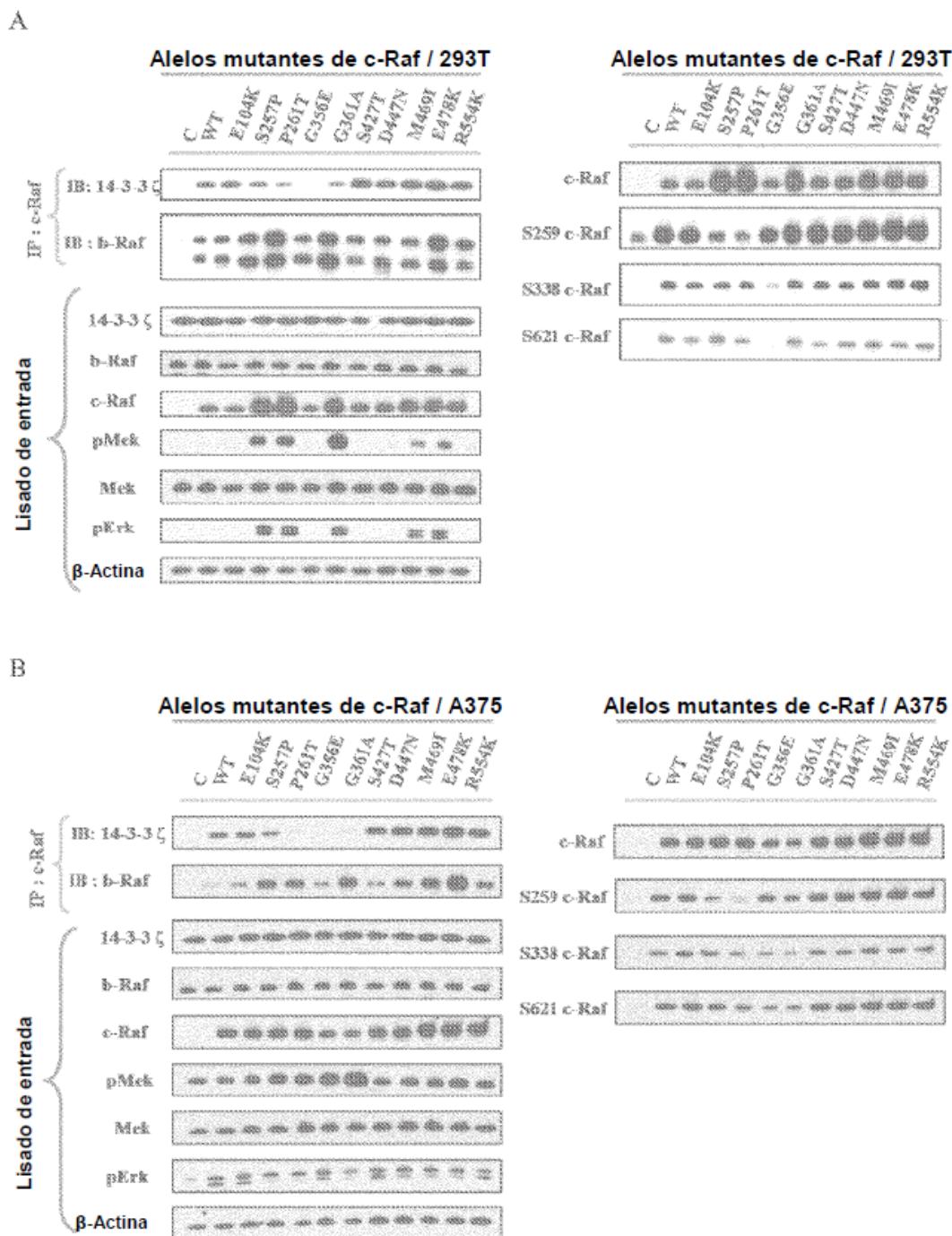
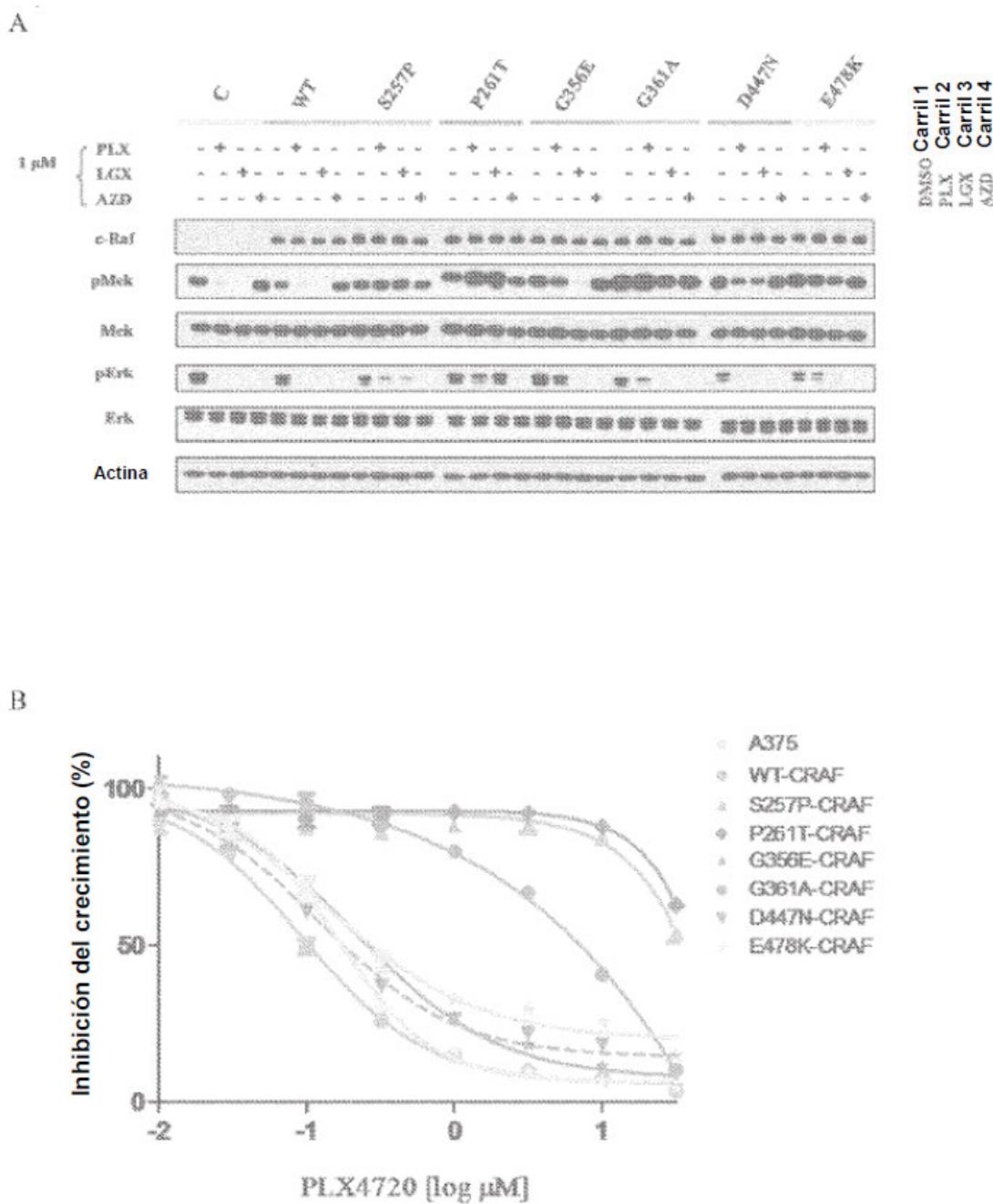
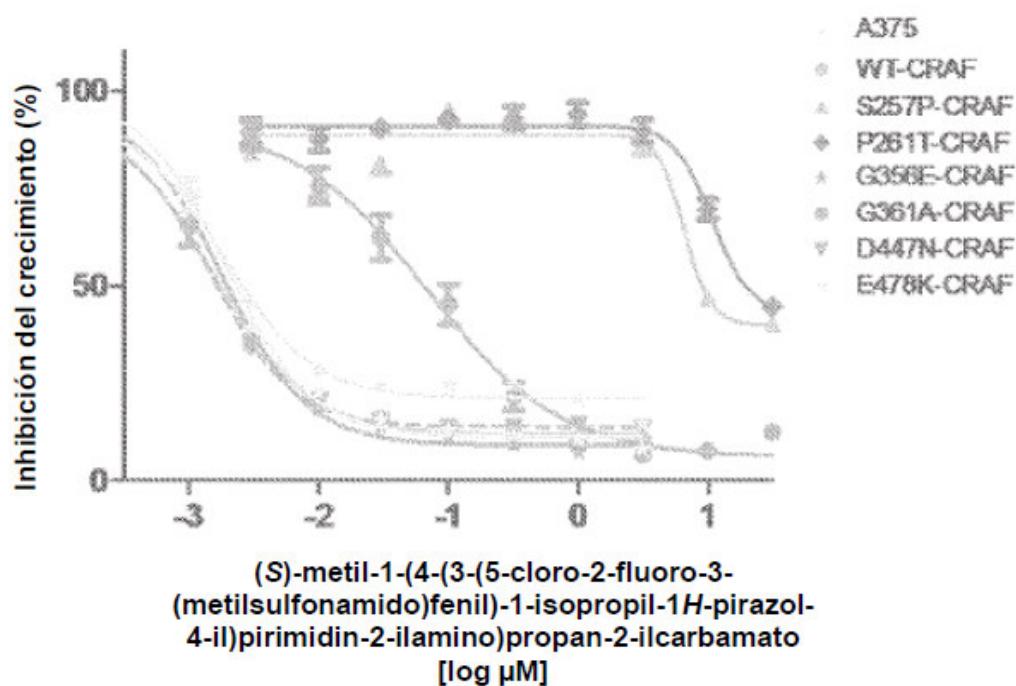
Figura 3

Figura 4

C



D

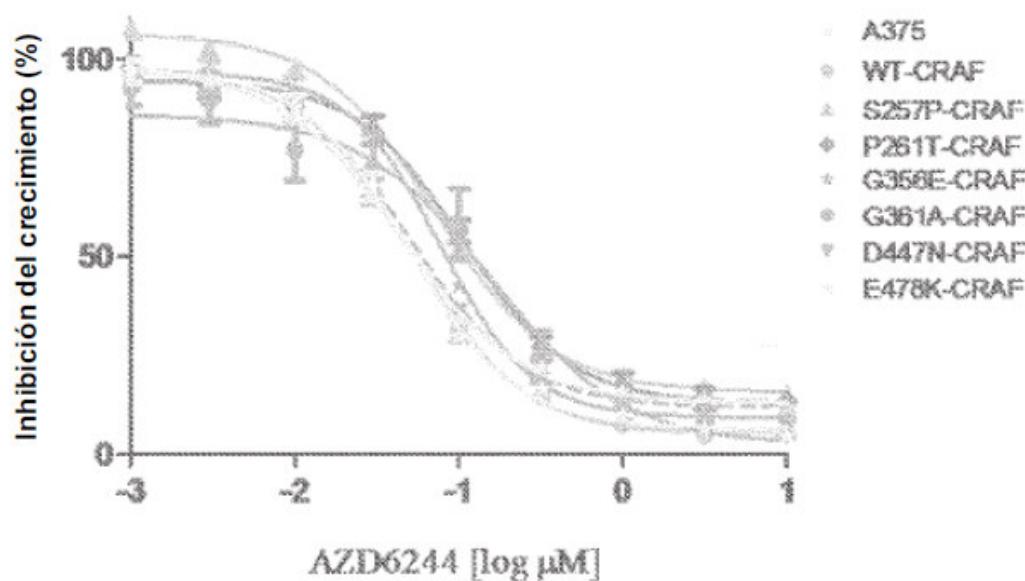
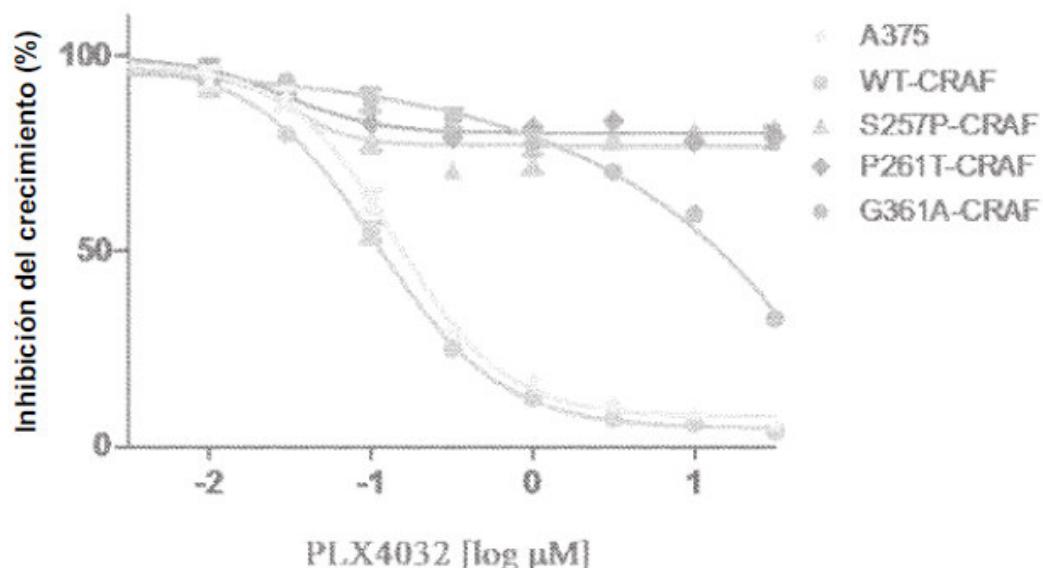
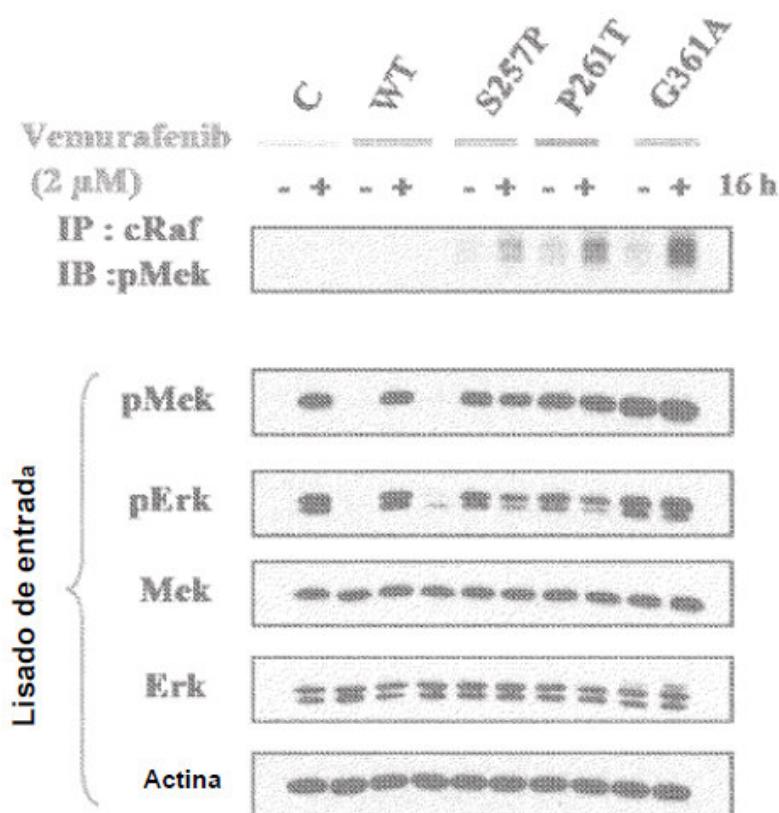


Figura 5

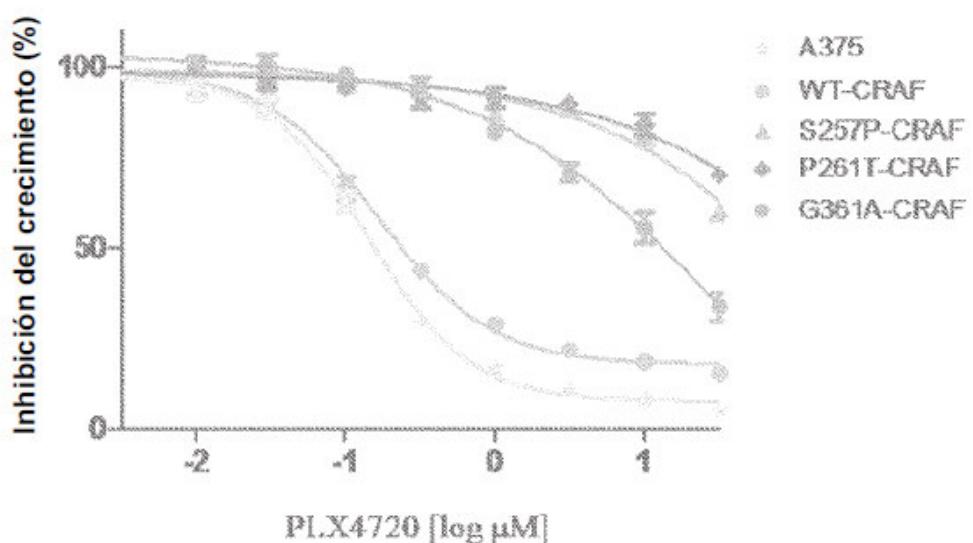
A



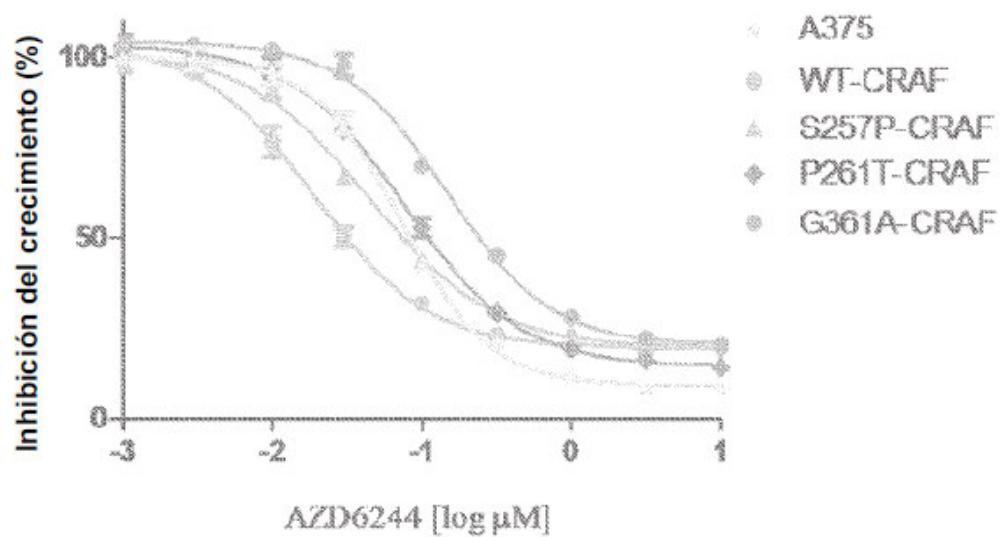
B

Ensayo de c-Raf quinasa / A375

C



D



E

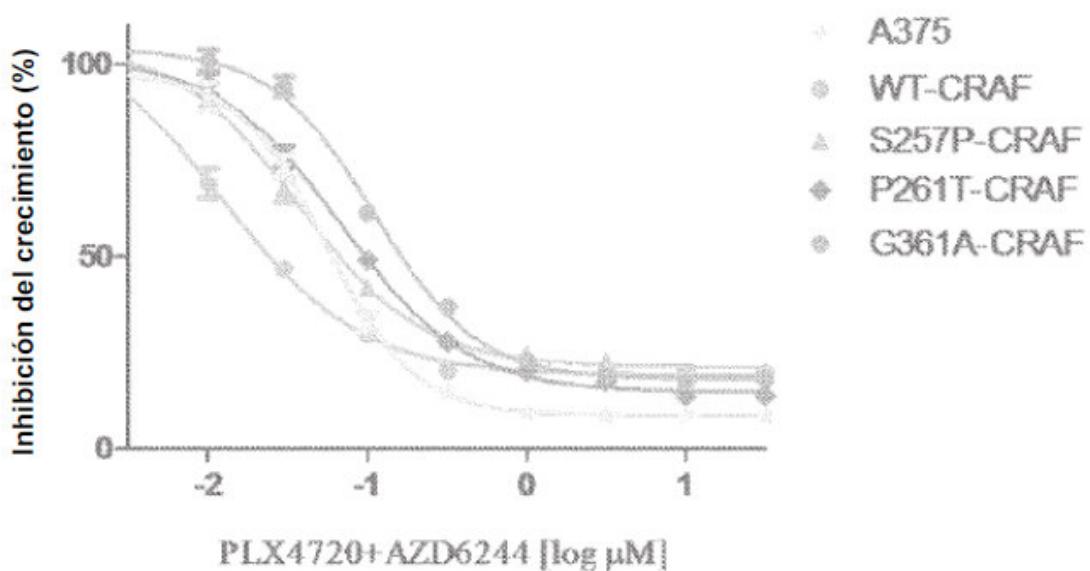


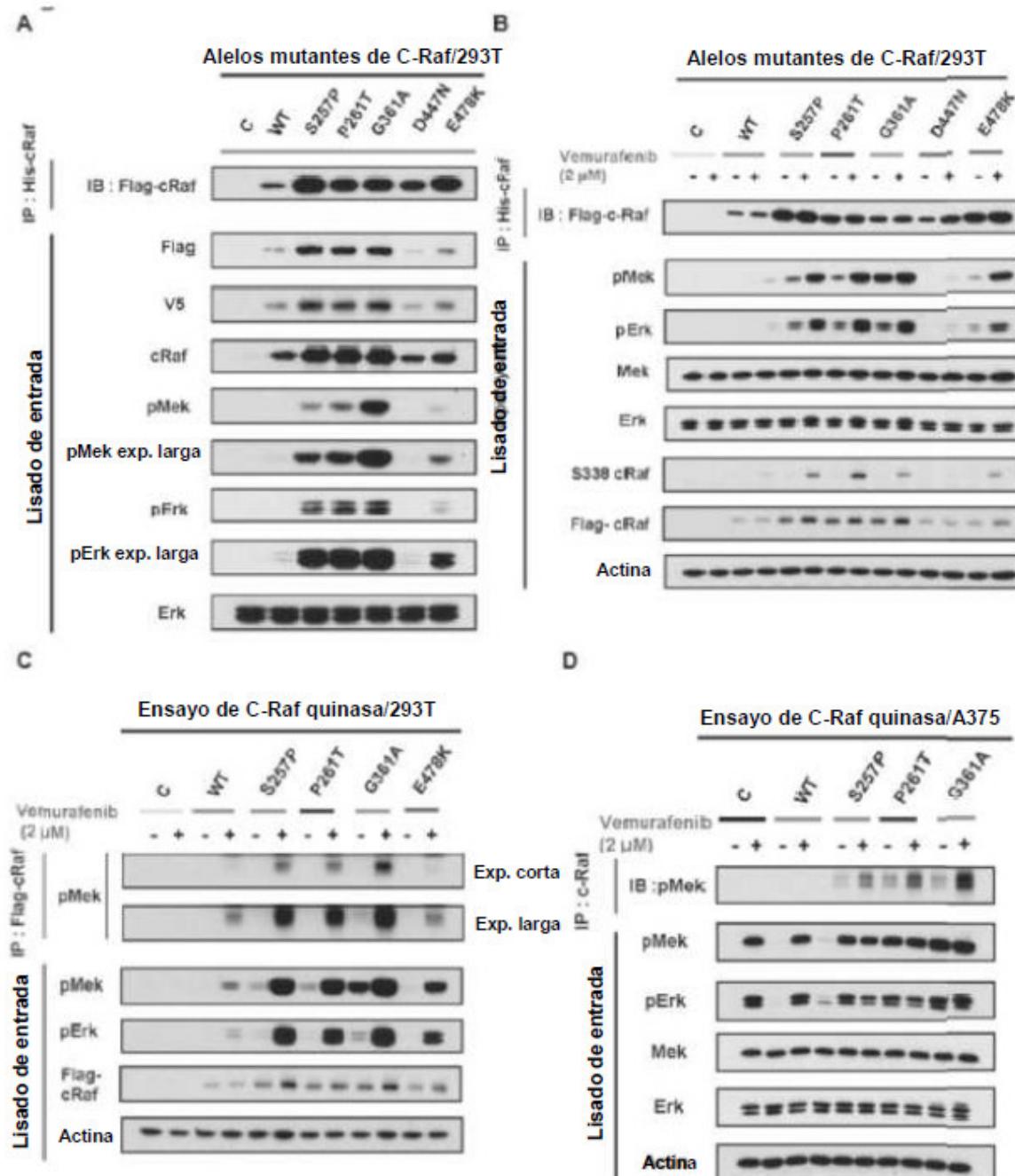
Figura 6

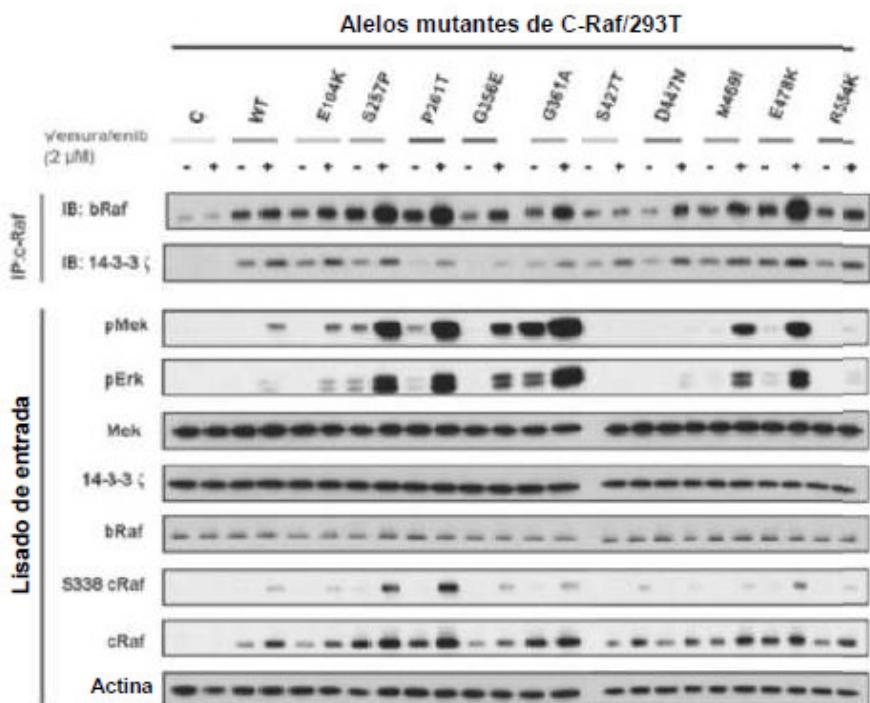
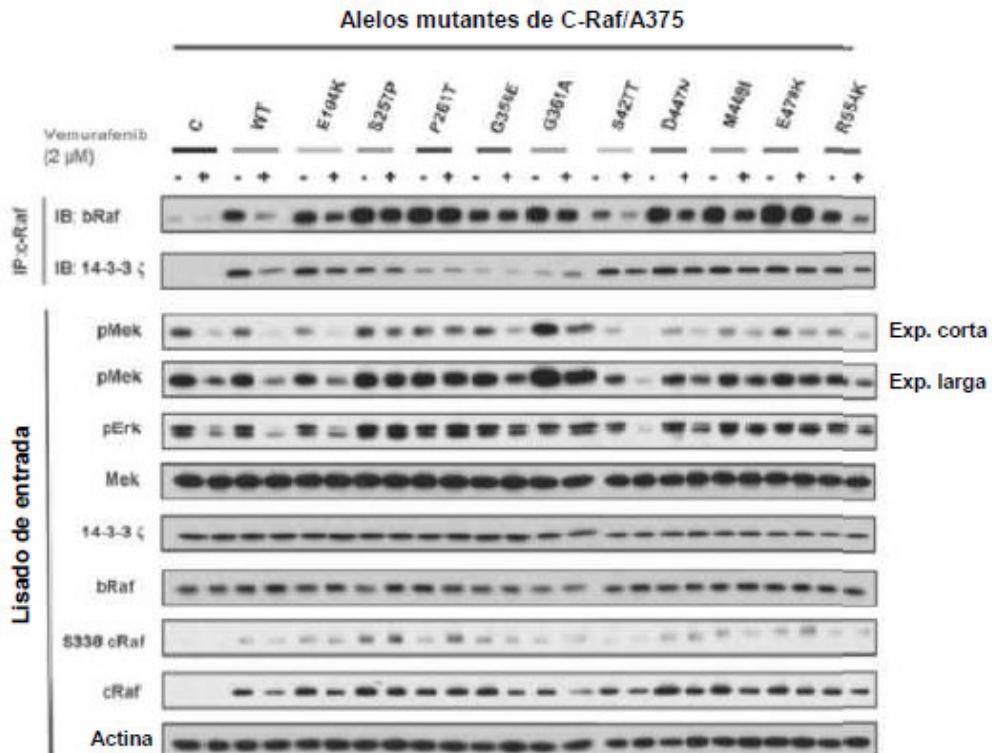
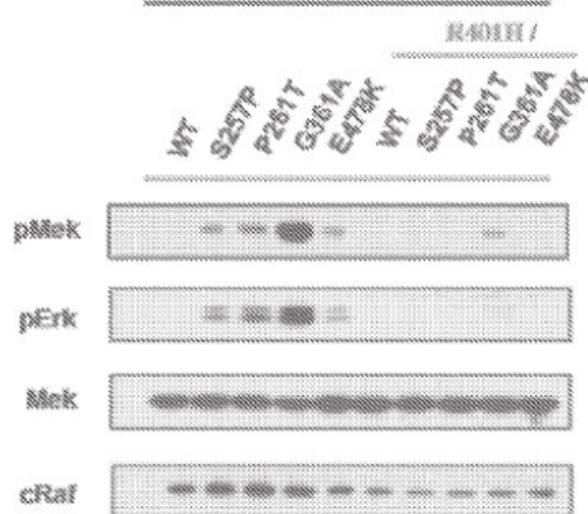
Figura 7**A****B**

Figura 8**A**

Alelos mutantes deficientes en dimerización de C-Raf / 293T

**B**

Alelos mutantes de c-Raf / 293T

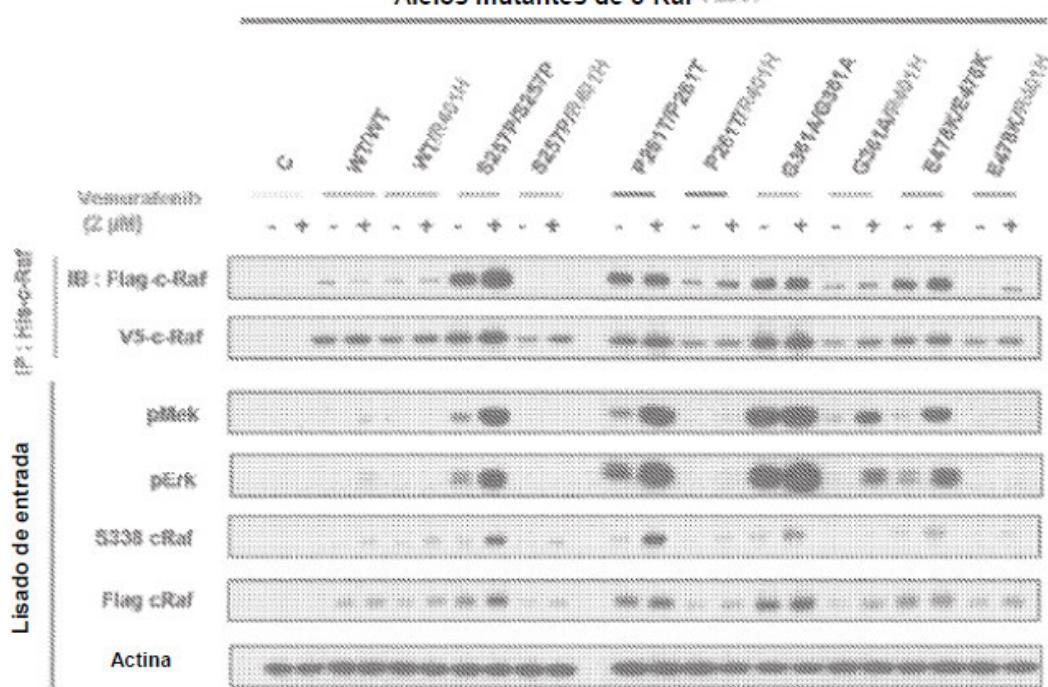


Figura 9

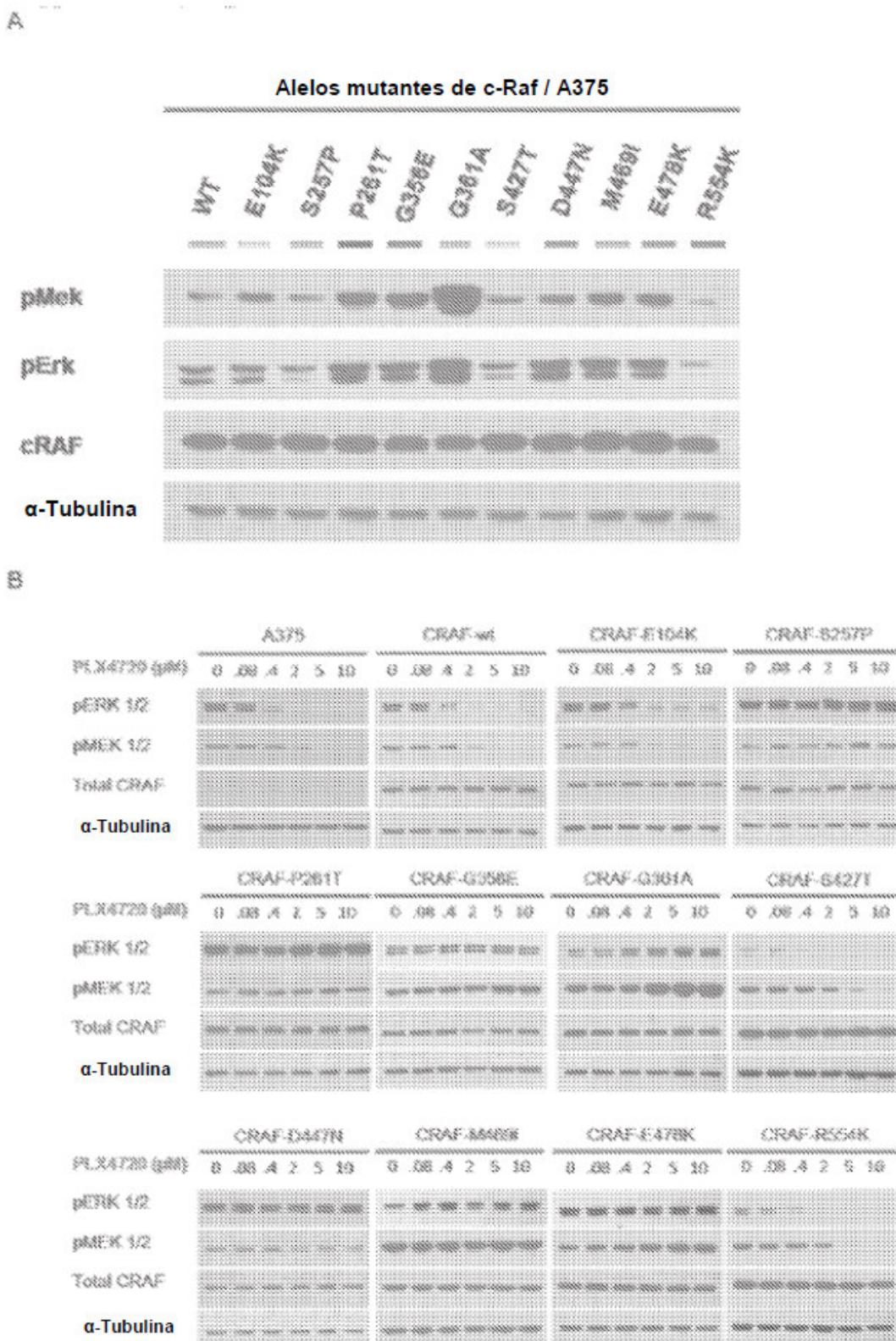
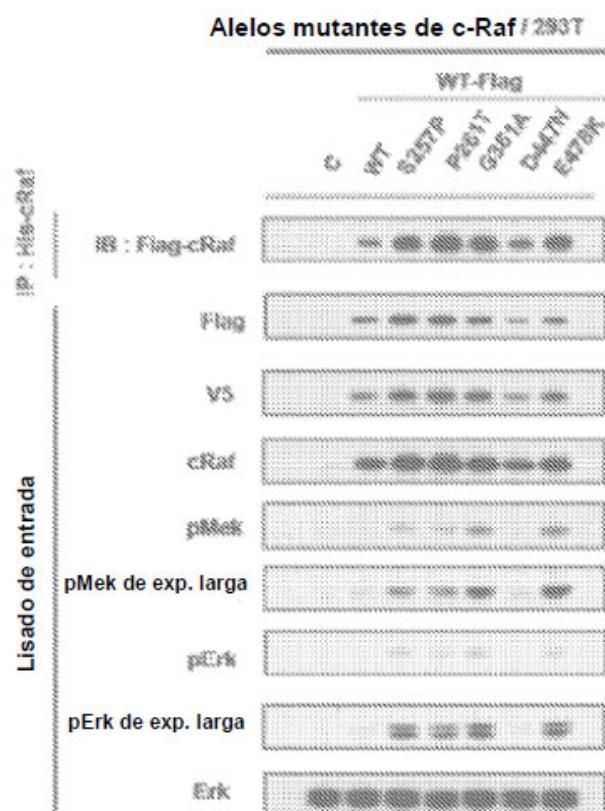


Figura 10**A****B**