

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 311**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4439** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/437** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014 PCT/US2014/071724**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095825**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14871217 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3082779**

54 Título: **Tratamientos contra el cáncer que usan combinaciones de inhibidores de ERK y MEK de tipo 2**

30 Prioridad:

**20.12.2013 US 201361919625 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.11.2023**

73 Titular/es:

**BIOMED VALLEY DISCOVERIES, INC. (100.0%)  
4435 Main Street Suite 550  
Kansas City, Missouri 64111, US**

72 Inventor/es:

**SAHA, SAURABH;  
WELSCH, DEAN;  
DECRESCENZO, GARY y  
ROIX, JEFFREY JAMES**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkingen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 953 311 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

Tratamientos contra el cáncer que usan combinaciones de inhibidores de ERK y MEK de tipo 2

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un primer agente anticancerígeno (i), que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y a un segundo agente anticancerígeno (ii), para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, en el que el segundo agente anticancerígeno es

(ii-1) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o

(ii-2) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 También se dan a conocer en el presente documento métodos, composiciones farmacéuticas y kits para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto usando un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

**Antecedentes de la invención**

15 Dentro de las redes de señalización celular, Ras y Raf desempeñan un papel importante en la regulación de diversos procesos biológicos, incluyendo crecimiento celular, proliferación, diferenciación, respuestas inflamatorias y muerte celular programada. En particular, las mutaciones en los genes ras fueron las primeras alteraciones genéticas identificadas en el cáncer humano. Las mutaciones activadoras de HRAS, NRAS y KRAS ("RAS"), así como BRAF, se encuentran con frecuencia en varios tipos de cáncer.

20 Un inhibidor de MEK es un agente que inhibe las enzimas proteína cinasa activadas por mitógenos, MEK1 y/o MEK2. Dependiendo de su diana y efecto, es decir, MEK1, MEK2 o ambos, los inhibidores de MEK pueden clasificarse como inhibidores de MEK de tipo 1, inhibidores de MEK de tipo 2 o inhibidores de pan-MEK. Se sabe que los inhibidores de MEK modulan, por ejemplo, la ruta de MAPK, que a menudo es hiperactiva en muchos cánceres y, por tanto, se ha usado en la terapia contra el cáncer. Desafortunadamente, muchos cánceres se vuelven  
25 resistentes al tratamiento con inhibidores de MEK a lo largo del tiempo.

Las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) son proteína cinasas que participan en la regulación del ciclo celular, incluyendo la regulación de la meiosis, la mitosis y las funciones posmitóticas en células diferenciadas. La interrupción de la ruta de ERK es común en los cánceres. Se han descrito inhibidores de ERK, tales como, por ejemplo, BVD-523 (documento WO2005/113541). Sin embargo, hasta la fecha, se ha avanzado poco en el  
30 desarrollo de inhibidores de ERK eficaces para el tratamiento contra el cáncer.

Se han descrito combinaciones de inhibidores de ERK y MEK1 para inhibir el crecimiento de células cancerosas (Hatzivassiliou *et al.* (Mol Cancer Ther; 11(5), mayo de 2012); Morris *et al.* (Cancer Discovery 2013;3:742-750); y Neuzillet *et al.* (Pharmacology & Therapeutics 141 (2014) 160-171)).

35 A medida que crece la comprensión de la base molecular del cáncer, se hace más hincapié en el desarrollo de fármacos que seleccionen como diana específicamente nodos particulares en las rutas que conducen al cáncer. En vista de las deficiencias señaladas anteriormente, existe, entre otros, la necesidad de tratamientos contra el cáncer dirigidos molecularmente eficaces, incluyendo las terapias combinadas. La presente solicitud está dirigida a satisfacer estas y otras necesidades.

**Sumario de la invención**

40 Una realización de la presente invención es un primer agente anticancerígeno (i), que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un segundo agente anticancerígeno (ii), para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, en el que el segundo agente anticancerígeno es (ii-1) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o (ii-2) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.  
45

Otra realización de la presente invención es un método *in vitro* para efectuar la muerte de células cancerosas que comprende poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad eficaz de un primer agente anticancerígeno (i), que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un segundo agente anticancerígeno (ii) que es  
50 (ii-1) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o (ii-2) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una realización adicional de la presente invención es un kit para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto que comprende una cantidad eficaz de un primer agente anticancerígeno (i), que es BVD-

523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. y un segundo agente anticancerígeno (ii) que es (ii-1) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o (ii-2) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, envasados junto con instrucciones para su uso.

5 Una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, comprendiendo la composición farmacéutica un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un primer agente anticancerígeno (i), que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un segundo agente anticancerígeno (ii) que es (ii-1) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, farmacéuticamente aceptable sales de los mismos y combinaciones de los mismos; o (ii-2) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo.

15 Otra realización de la presente invención es una composición para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, en la que la composición comprende BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en combinación con (i) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o (ii) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Una realización adicional de la presente invención es una composición para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, en la que la composición comprende (i) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o (ii) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación con BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 **Breve descripción de los dibujos**

Las figuras 1A-C muestran el progreso de un estudio de aumento de la dosis en una línea celular de melanoma maligno humano (células A375) para el mes 1. Diversos tratamientos (trametinib (un inhibidor de MEK de tipo 2), dabrafenib (un inhibidor de BRAF) y BVD-523 (un inhibidor de ERK1/2)) son tal como se etiquetan.

30 Las figuras 2A-H muestran los resultados de un ensayo de proliferación que rastrea los cambios en la sensibilidad a los agentes aumentados durante el mes 1. Diversos tratamientos (trametinib, dabrafenib, BVD-523 y paclitaxel) están etiquetados en la parte superior del gráfico. La leyenda a la derecha del gráfico muestra los diversos tipos de células generadas a partir del estudio de aumento de la dosis. Por ejemplo, "dabrafenib" se refiere a las células que se han tratada con la dosis más alta de dabrafenib desde el mes 1 del estudio de aumento de la dosis. Parental se refiere a las células de control que no se han tratado con fármacos. Las figuras 2A-2C y 2G están normalizadas con respecto al control, mientras que las figuras 2D-2F y 2H muestran los datos sin procesar.

Las figuras 3A-3D muestran el progreso de un estudio de aumento de la dosis en células A375 durante el mes 2. Diversos tratamientos (trametinib, dabrafenib y BVD-523) son tal como se etiquetan.

40 Las figuras 4A-H muestran los resultados de un ensayo de proliferación que rastrea los cambios en la sensibilidad a los agentes aumentados en el mes 2. Diversos tratamientos (trametinib, dabrafenib, BVD-523 y paclitaxel) son tal como se etiquetan en la parte superior del gráfico. La leyenda a la derecha del gráfico muestra los diversos tipos de células generadas a partir del estudio de aumento de la dosis. Por ejemplo, "dabrafenib" se refiere a las células que se han tratado con la dosis más alta de dabrafenib desde el mes 2 del estudio de aumento de la dosis. Parental se refiere a las células de control que no se han tratado con fármacos. Las figuras 4A-4C y 4G están normalizadas con respecto al control, mientras que las figuras 4D-4F y 4H muestran los datos sin procesar.

45 Las figuras 5A-H muestran sólo los datos de la línea celular parental y BVD-523 de la figura 4. Diversos tratamientos (trametinib, dabrafenib, BVD-523 y paclitaxel) son tal como se etiquetan. Las figuras 5A-5C y 5G están normalizadas con respecto al control, mientras que las figuras 5D-5F y 5H muestran los datos sin procesar.

50 Las figuras 6A-D muestran el progreso del estudio de aumento de la dosis en una línea de células malignas humanas (células A375) durante el mes 3. Diversos tratamientos (trametinib, dabrafenib y BVD-523) son tal como se etiquetan.

La figura 7 es un histograma que muestra los resultados de un ensayo de proliferación aplicado a células cultivadas en los pocillos de control de DMSO del ensayo de aumento de la dosis.

55 Las figuras 8A-D son un conjunto de gráficos lineales que muestran ensayos de proliferación durante el mes 3 del estudio. Diversos tratamientos (trametinib, dabrafenib, BVD-523 y paclitaxel) son tal como se etiquetan en la parte superior del gráfico. La leyenda a la derecha del gráfico muestra los diversos tipos de células generadas a partir del estudio de aumento de la dosis. Por ejemplo, "dabrafenib" se refiere a las células que se han tratado con la dosis

más alta de dabrafenib desde el mes 3 del estudio de aumento de la dosis. Parental se refiere a las células de control que no se han tratado con fármacos.

Las figuras 9A-D muestran sólo los datos de la línea celular parental, dabrafenib y BVD-523 de la figura 8.

5 La figura 10A es una matriz de dosis que muestra el % de inhibición de la combinación de trametinib/dabrafenib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue. La figura 10B es una matriz de dosis que muestra un exceso sobre Bliss para la combinación de trametinib/dabrafenib. Las figuras 10C y 10D muestran el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para los tratamientos con agente único de dabrafenib y trametinib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue. La figura 10E muestra el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para tratamientos combinados de dabrafenib y trametinib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue.

15 La figura 11A es una matriz de dosis que muestra el % de inhibición de la combinación de trametinib/dabrafenib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo. La figura 11B es una matriz de dosis que muestra un exceso sobre Bliss para la combinación de trametinib/dabrafenib. Las figuras 11C y 11D muestran el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para los tratamientos con agente único de dabrafenib y trametinib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo. La figura 11E muestra el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para tratamientos combinados de dabrafenib y trametinib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo.

20 La figura 12A es una matriz de dosis que muestra el % de inhibición de la combinación de BVD-523/dabrafenib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue. La figura 12B es una matriz de dosis que muestra un exceso sobre Bliss para la combinación de BVD-523/dabrafenib. Las figuras 12C y 12D muestran el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para tratamientos con dabrafenib y BVD-523 como agente único en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue. La figura 12E muestra el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para los tratamientos combinados con dabrafenib y BVD-523 en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue.

25 La figura 13A es una matriz de dosis que muestra el % de inhibición de la combinación de BVD-523/dabrafenib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo. La figura 13B es una matriz de dosis que muestra un exceso sobre Bliss para la combinación de BVD-523/dabrafenib. Las figuras 13C y 13D muestran el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para tratamientos con dabrafenib y BVD-523 como agente único en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo. La figura 13E muestra el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para tratamientos combinados con dabrafenib y BVD-523 en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo.

30 La figura 14A es una matriz de dosis que muestra el % de inhibición de la combinación de trametinib/BVD-523 en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue. La figura 14B es una matriz de dosis que muestra un exceso sobre Bliss para la combinación de trametinib/BVD-523. Las figuras 14C y 14D muestran el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para los tratamientos con agente único BVD-523 y trametinib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue. La figura 14E muestra el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para tratamientos combinados de BVD-523 y trametinib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue.

35 La figura 15A es una matriz de dosis que muestra el % de inhibición de la combinación de trametinib/BVD-523 en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo. La figura 15B es una matriz de dosis que muestra un exceso sobre Bliss para la combinación de trametinib/BVD-523. Las figuras 15C y 15D muestran el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para los tratamientos con agente único BVD-523 y trametinib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo. La figura 15E muestra el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO para tratamientos combinados de BVD-523 y trametinib en células A375 usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo.

40 Las figuras 16A-D son un conjunto de imágenes que muestran un análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la señalización de MAPK en células A375 después de un tratamiento de 4 horas con diversas concentraciones (en nM) de BVD-523, dabrafenib (Dab) y trametinib (Tram). Se cargaron 40 µg de proteína total en cada carril excepto cuando se indique lo contrario. En este experimento, se recogieron muestras por duplicado. Las figuras 16A y 16B muestran resultados de muestras duplicadas. De manera similar, las figuras 16C y 16D también muestran resultados de muestras duplicadas. En las figuras 16A y 16B, pRSK1 tenía una señal relativamente débil en las células A375 en comparación con otros marcadores. Se probó un anticuerpo pRSK1-S380 diferente de Cell Signaling (n.º de cat. 11989), pero no dio una señal detectable (datos no mostrados). En las figuras 16C y 16D, pCRAF-338 dio una señal mínima.

55 Las figuras 17A-D son un conjunto de imágenes que muestran el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la señalización de MAPK en una línea celular de carcinoma colorrectal humano (células HCT116) después de un tratamiento de 4 horas con diversas concentraciones (en nM) de BVD-523, dabrafenib (Dab) y trametinib (Tram). Se cargaron 40 µg de proteína total en cada carril excepto cuando se indique lo contrario. En este experimento, se

recogieron muestras por duplicado. Las figuras 17A y 17B muestran resultados de muestras duplicadas. De manera similar, las figuras 17C y 17D también muestran resultados de muestras duplicadas. En las figuras 17A-17B, los niveles de pRSK1 parecen ser muy bajos en las células HCT116, y en las figuras 17C y 17D, la señal de pCRAF-338 también era muy débil.

- 5 Las figuras 18A-D son un conjunto de imágenes que muestran el análisis de inmunotransferencia de tipo Western del ciclo celular y la señalización de la apoptosis en células de melanoma A375 después de un tratamiento de 24 horas con diversas concentraciones (en nM) de BVD-523 (“BVD523”), trametinib (“Tram”) y/o dabrafenib (“Dab”) tal como se etiqueta. Se cargaron 50 µg de proteína total en cada carril excepto cuando se indique lo contrario. En este experimento, se recogieron muestras por duplicado. Las figuras 18A y 18B muestran resultados de muestras duplicadas. De manera similar, las figuras 18C y 18D también muestran resultados de muestras duplicadas. En las figuras 18A y 18B, no era evidente ninguna banda de un tamaño correspondiente a PARP escindida (89 kDa).

La figura 19 es un diagrama de flujo que muestra el protocolo de aumento de la dosis usado en el presente documento.

- 15 La figura 20 muestra los resultados de los ensayos de proliferación de un solo agente en células parentales A375 y A375 NRAS (Q61K/+). Se muestran los resultados de proliferación para el tratamiento con BVD-523 (figura 20A), SCH772984 (figura 20B), trametinib (figura 20C), MEK-162 (figura 20D), GDC-0623 (figura 20E), GDC-0973 (figura 20F) y paclitaxel (figura 20G).

- 20 La figura 21 muestra los resultados de los ensayos de proliferación de un solo agente en células parentales HCT116 y A375 KRAS KO (-/+). Se muestran los resultados de proliferación para el tratamiento con BVD-523 (figura 21A), SCH772984 (figura 21B), trametinib (figura 21C), MEK-162 (figura 21D), GDC-0623 (figura 21E), GDC-0973 (figura 21F) y paclitaxel (figura 21G).

- 25 La figura 22 muestra los resultados de los ensayos de proliferación de agente único en células parentales RKO y RKO BRAF V600E KO (+/-). Los resultados de proliferación se muestran para el tratamiento con BVD-523 (figura 22A), SCH772984 (figura 22B), trametinib (figura 22C), MEK-162 (figura 22D), GDC-0623 (figura 22E), GDC-0973 (figura 22F) y paclitaxel (figura 22G).

- 30 La figura 23 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y trametinib en células parentales A375 y A375 NRAS (Q61K/+). La figura 23A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 parentales. La figura 23B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 23A y la figura 23C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 23A. La figura 23D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación en células A375 NRAS (Q61 K/+). La figura 23E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 23D y la figura 23F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 23D. Las figuras 23G - 23H muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 23A. Las figuras 23I - 23J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 23D.

- 35 La figura 24 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y trametinib en células parentales A375 y A375 NRAS (Q61K/+). La figura 24A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 parentales. La figura 24B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 24A y la figura 24C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 24A. La figura 24D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 NRAS (Q61K/+). La figura 24E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 24D y la figura 24F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 24D. Las figuras 24G - 24H muestran los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 24A. Las figuras 24I - 24J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 24D.

- 45 La figura 25 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y MEK-162 en células parentales A375 y A375 NRAS (Q61K/+). La figura 25A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 parentales. La figura 25B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 25A y la figura 25C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 25A. La figura 25D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 NRAS (Q61K/+). La figura 25E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 25D y la figura 25F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 25D. Las figuras 25G - 25H muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 25A. Las figuras 25I - 25J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 25D.

- 50 La figura 26 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y MEK-162 en células parentales A375 y A375 NRAS (Q61K/+). La figura 26A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 parentales. La figura 26B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 26A y la figura 26C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 26A. La figura 26D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 NRAS (Q61K/+). La figura 26E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 26D y la figura 26F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 26D. Las figuras 26G - 26H muestran los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 26A. Las figuras 26I - 26J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 26D.

La figura 27 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y GDC-0623 en células parentales A375 y A375

NRAS (Q61K/+). La figura 27A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 parentales. La figura 27B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 27A y la figura 27C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 27A. La figura 27D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación en células A375 NRAS (Q61K/+). La figura 27E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 27D y la figura 27F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 27D. Las figuras 27G - 27H muestran los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 27A. Las figuras 27I - 27J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 27D.

La figura 28 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y GDC-0623 en células parentales A375 y A375 NRAS (Q61K/+). La figura 28A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375 parentales. La figura 28B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 28A y la figura 28C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 28A. La figura 28D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación en células A375 NRAS (Q61K/+). La figura 28E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 28D y la figura 28F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 28D. Las figuras 28G - 28H muestra los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 28A. Las figuras 28I - 28J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 28D.

La figura 29 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y trametinib en células parentales HCT116 y HCT116 KRAS KO (+/-). La figura 29A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células HCT116 parentales. La figura 29B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 29A y la figura 29C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 29A. La figura 29D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células HCT116 KRAS KO (+/-). La figura 29E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 29D y la figura 29F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 29D. Las figuras 29G - 29H muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 29A. Las figuras 29I - 29J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 29D.

La figura 30 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y trametinib en células parentales HCT116 y HCT116 KRAS KO (+/-). La figura 30A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células HCT116 parentales. La figura 30B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 30A y la figura 30C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 30A. La figura 30D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células HCT116 KRAS KO (+/-). La figura 30E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 30D y la figura 30F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 30D. Las figuras 30G - 30H muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 30A. Las figuras 30I - 30J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 30D.

La figura 31 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y MEK-162 en células parentales HCT116 y HCT116 KRAS KO (+/-). La figura 31A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células HCT116 parentales. La figura 31B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 31A y la figura 31C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 31A. La figura 31D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células HCT116 KRAS KO (+/-). La figura 31E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 31D y la figura 31F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 31D. Las figuras 31G - 31H muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 31A. Las figuras 31I - 31J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 31D.

La figura 32 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y MEK-162 en células parentales HCT116 y HCT116 KRAS KO (+/-). La figura 32A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células HCT116 parentales. La figura 32B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 32A y la figura 32C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 32A. La figura 32D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células HCT116 KRAS KO (+/-). La figura 32E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 32D y la figura 32F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 32D. Las figuras 32G - 32H muestran los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 32A. Las figuras 32I - 32J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 32D.

La figura 33 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y trametinib en células parentales RKO y RKO BRAF V600E KO (+/-/-). La figura 33A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células RKO parentales. La figura 33B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 33A y la figura 33C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 33A. La figura 33D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación en células RKO BRAF V600E KO (+/-/-). La figura 33E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 33D y la figura 33F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 33D. La figura 33G - FIG. 33H muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 33A. Las figuras 33I - 33J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 33D.

La figura 34 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y trametinib en células parentales RKO y RKO BRAF V600E KO (+/-/-). La figura 34A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células RKO parentales. La figura 34B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 34A y la figura 34C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 34A. La figura 34D muestra una matriz de dosis que muestra la

- 5 inhibición (%) para la combinación en células RKO BRAF V600E KO (+/-/-). La figura 34E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 34D y la figura 34F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 34D. Las figuras 34G - 34H muestra los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 34A. Las figuras 34I - 34J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 34D.
- 10 La figura 35 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y MEK-162 en células parentales RKO y RKO BRAF V600E KO (+/-/-). La figura 35A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células RKO parentales. La figura 35B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 35A y la figura 35C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 35A. La figura 35D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación en células RKO BRAF V600E KO (+/-/-). La figura 35E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 35D y la figura 35F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 35D. Las figuras 35G - 35H muestran los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 35A. Las figuras 35I - 35J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 35D.
- 15 La figura 36 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y MEK-162 en células parentales RKO y RKO BRAF V600E KO (+/-/-). La figura 36A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células RKO parentales. La figura 36B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 36A y la figura 36C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 36A. La figura 36D muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación en células RKO BRAF V600E KO (+/-/-). La figura 36E muestra el exceso de Loewe para la combinación en 36D y la figura 36F muestra el exceso de Bliss para la combinación en 36D. Las figuras 36G - 36H muestra los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 36A. Las figuras 36I - 36J muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 36D.
- 20 La figura 37 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y trametinib en células G-361. La figura 37A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. La figura 37B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 37A y la figura 37C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 37A. Las figuras 37D - 37E muestra los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 37A.
- 25 La figura 38 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y trametinib en células G-361. La figura 38A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. La figura 38B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 38A y la figura 38C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 38A. Las figuras 38D - 38E muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 38A.
- 30 La figura 39 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y MEK-162 en células G-361. La figura 39A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. La figura 39B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 39A y la figura 39C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 39A. Las figuras 39D - 39E muestra los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 39A.
- 35 La figura 40 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y MEK-162 en células G-361. La figura 40A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación. La figura 40B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 40A y la figura 40C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 40A. Las figuras 40D - 40E muestran los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 40A.
- 40 La figura 41 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y GDC-0623 en células G-361. La figura 41A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. La figura 41B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 41A y la figura 41C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 41A. Las figuras 41D - 41E muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 41A.
- 45 La figura 42 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y GDC-0623 en células G-361. La figura 42A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. La figura 42B muestra el exceso de Loewe para la combinación en 42A y la figura 42C muestra el exceso de Bliss para la combinación en 42A. Las figuras 42D - 42E muestra los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 42A.
- 50 La figura 43 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y trametinib en células A549. La figura 43A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 43B - 43C muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 43A. La figura 43D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 43A y la figura 43E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 43A.
- 55 La figura 44 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y trametinib en células H2122. La figura 44A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 44B - 44C muestran los

resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 44A. La figura 44D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 44A y la figura 44E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 44A.

5 La figura 45 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y trametinib en células H1437. La figura 45A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 45B - 45C muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 45A. La figura 45D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 45A y la figura 45E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 45A.

10 La figura 46 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y trametinib en células H226. La figura 46A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 46B - 46C muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 46A. La figura 46D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 46A y la figura 46E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 46A.

15 La figura 47 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y trametinib en células A549. La figura 47A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 47B - 47C muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 47A. La figura 47D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 47A y la figura 47E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 47A.

20 La figura 48 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y trametinib en células H2122. La figura 48A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 48B - 48C muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 48A. La figura 48D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 48A y la figura 48E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 48A.

25 La figura 49 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y trametinib en células H1437. La figura 49A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 49B - 49C muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 49A. La figura 49D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 49A y la figura 49E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 49A.

30 La figura 50 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y trametinib en células H226. La figura 50A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación. Las figuras 50B - 50C muestra los resultados de los ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 50A. La figura 50D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 50A y la figura 50E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 50A.

35 La figura 51 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y GDC-0623 en células H2122. La figura 51A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 51B - 51C muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 51A. La figura 51D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 51A y la figura 51E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 51A.

40 La figura 52 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y GDC-0623 en células H1437. La figura 52A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 52B - 52C muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 52A. La figura 52D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 52A y la figura 52E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 52A.

45 La figura 53 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y GDC-0623 en células H226. La figura 53A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 53B - 53C muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 53A. La figura 53D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 53A y la figura 53E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 53A.

50 La figura 54 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y GDC-0623 en células A549. La figura 54A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 54B - 54C muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 54A. La figura 54D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 54A y la figura 54E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 54A.

55 La figura 55 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y GDC-0623 en células H2122. La figura 55A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 55B - 55C muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 55A. La figura 55D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 55A y la figura 55E muestra el exceso de Bliss para la combinación en

55A.

5 La figura 56 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y GDC-0623 en células H1437. La figura 56A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 56B - 56C muestra los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 56A. La figura 56D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 56A y la figura 56E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 56A.

10 La figura 57 muestra los resultados de la combinación de SCH772984 y GDC-0623 en células H226. La figura 57A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) para la combinación. Las figuras 57B - 57C muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 57A. La figura 57D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 57A y la figura 57E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 57A.

15 La figura 58 muestra los resultados de la combinación de BVD-523 y SCH772984. La figura 58A muestra una matriz de dosis que muestra la inhibición (%) de la combinación en células A375. Las figuras 58B - 58C muestran los resultados de ensayos de proliferación de agente único para la combinación en 58A. La figura 58D muestra el exceso de Loewe para la combinación en 58A y la figura 58E muestra el exceso de Bliss para la combinación en 58A.

### Descripción detallada de la invención

20 En el presente documento se da a conocer un método para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto que lo necesita. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK de tipo 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar o mejorar los efectos del cáncer.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratar”, “que trata”, “tratamiento” y variaciones gramaticales de los mismos significan someter a un sujeto individual a un protocolo, régimen, proceso o remedio, en el que se desea obtener una respuesta o resultado fisiológico en ese sujeto, por ejemplo, un paciente. En particular, los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden usarse para retrasar el desarrollo de los síntomas de la enfermedad o retrasar la aparición de la enfermedad o afección, o detener la progresión del desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, debido a que cada sujeto tratado puede no responder a un protocolo, régimen, proceso o remedio de tratamiento en particular, el tratamiento no requiere que se logre la respuesta fisiológica o el resultado deseado en todos y cada uno de los sujetos o población de sujetos, por ejemplo, población de pacientes. Por consiguiente, un sujeto dado o una población de sujetos, por ejemplo, la población de pacientes puede no responder o responder de manera inadecuada al tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “mejorar”, “que mejora” y variaciones gramaticales de los mismos significan disminuir la gravedad de los síntomas de una enfermedad en un sujeto.

35 En la presente divulgación, los cánceres incluyen tanto cánceres sólidos como hematológicos. Los ejemplos no limitativos de cánceres sólidos incluyen carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de vejiga, cáncer de hueso (tal como osteosarcoma), cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer carcinoide, carcinoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer del conducto biliar extrahepático, familia de cánceres de Ewing, cáncer de células germinales extracraneal, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hipofaringe, carcinoma de células de los islotes, cáncer de riñón, cáncer de intestino grueso, cáncer de laringe, cáncer, leucemia, cáncer de labio y cavidad oral, tumor/cáncer de hígado, tumor/cáncer de pulmón, linfoma, mesotelioma maligno, carcinoma de células de Merkel, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer epitelial de ovario, cáncer de células germinales de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de hipófisis, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, rhabdomyosarcoma, cáncer de recto, cáncer de células renales, cáncer de células de transición del pelvis renal y uréter, cáncer de glándulas salivales, síndrome de Sezary, cánceres de piel (tales como linfoma cutáneo de células T, sarcoma de Kaposi, tumor de mastocitos y melanoma), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer testicular, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva y tumor de Wilms.

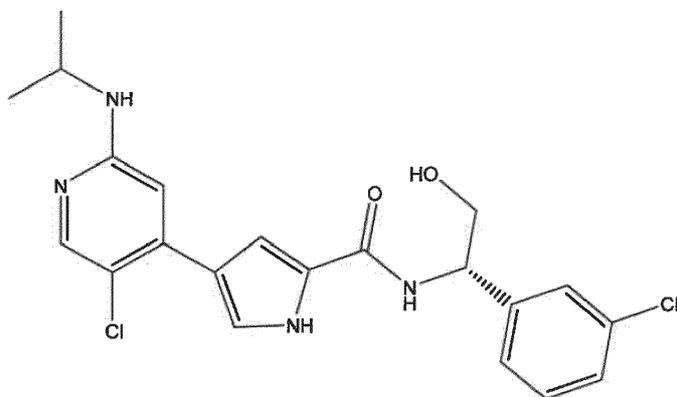
55 Los ejemplos de cánceres hematológicos incluyen, pero no se limitan a, leucemias, tales como leucemia linfoblástica aguda en adultos/niños, leucemia mielóide aguda en adultos/niños, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de células pilosas, linfomas, tales como los relacionados con el SIDA, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin adulto/infantil, micosis fungoide, linfoma no Hodgkin adulto/infantil, linfoma primario del sistema nervioso central, síndrome de Sézary, linfoma cutáneo de células T y macroglobulinemia de Waldenström, así como otros trastornos proliferativos tales como trastornos mieloproliferativos crónicos, histiocitosis de células de Langerhans, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos y neoplasias

mielodisplásicas/mieloproliferativas.

Un conjunto preferido de cánceres que pueden tratarse según la presente divulgación incluye cáncer de intestino grueso, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de endometrio, neuroblastoma, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de testículo y cáncer de tiroides. Preferiblemente, el cáncer es melanoma.

Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero, preferiblemente, un ser humano. Además de los seres humanos, las categorías de mamíferos dentro del alcance de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, animales de granja, animales domésticos, animales de laboratorio, etc. Algunos ejemplos de animales de granja incluyen vacas, cerdos, caballos, cabras, etc. Algunos ejemplos de los animales domésticos incluyen perros, gatos, etc. Algunos ejemplos de animales de laboratorio incluyen primates, ratas, ratones, conejos, conejillos de indias, etc.

En la presente divulgación, BVD-523 corresponde a un compuesto de fórmula (I):



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. BVD-523 puede sintetizarse según los métodos descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7.354.939. Los enantiómeros y las mezclas racémicas de ambos enantiómeros de BVD-523 también se contemplan dentro del alcance de la presente divulgación. BVD-523 es un inhibidor de ERK1/2 con un mecanismo de acción que se cree que es, por ejemplo, único y distinto de otros inhibidores de ERK1/2, tales como SCH772984 y la estructura de pirimidinal usada por Hatzivassiliou *et al.* (2012). Por ejemplo, otros inhibidores de ERK1/2, tales como SCH772984, inhiben la autofosforilación de ERK (Morris *et al.*, 2013), mientras que BVD-523 permite la autofosforilación de ERK sin dejar de inhibir ERK. (Véase, por ejemplo, la figura 18).

Tal como se usa en el presente documento, un "inhibidor de MEK", tal como un inhibidor de MEK de tipo 2, significa aquellas sustancias que (i) interactúan directamente con MEK (es decir, MEK2), por ejemplo, uniéndose a MEK (es decir, MEK2) y (ii) disminuyen la expresión o la actividad de MEK (es decir, MEK2). Por tanto, los inhibidores que actúan aguas arriba de MEK (es decir, MEK2), tales como los inhibidores de RAS y los inhibidores de RAF, no son inhibidores de MEK (es decir, MEK2) según la presente divulgación. Tal como se señaló anteriormente, los inhibidores de MEK pueden clasificarse en dos tipos dependiendo de si el inhibidor compite con ATP. Tal como se usa en el presente documento, los inhibidores de MEK de "tipo 1" significan aquellos inhibidores que compiten con el ATP por unirse a MEK. Inhibidores de MEK de "tipo 2" significan aquellos que no compiten con ATP para unirse a MEK.

Los ejemplos no limitativos de inhibidores de MEK de tipo 2 según la presente divulgación incluyen la toxina del ántrax, la porción del factor letal de la toxina del ántrax, ARRY-142886 ácido (6-(4-bromo-2-cloro-fenilamino)-7-fluoro-3-metil-3H-benzimidazol-5-carboxílico (2-hidroxi-etoxi)-amida) (Array BioPharma), ARRY-438162 (Array BioPharma), AS-1940477 (Astellas), MEK162 (Array BioPharma), PD 098059 (2-(2'-amino-3'-metoxifenil)-oxanaftalen-4-ona), PD 184352 (CI-1040), PD-0325901 (Pfizer), pimasertib (Santhera Pharmaceuticals), refametinib (AstraZeneca), selumetinib (AZD6244) (AstraZeneca), TAK-733 (Takeda), trametinib (Japan Tobacco), U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)butadieno) (Sigma), RDEA119 (Ardea Biosciences /Bayer), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el inhibidor de MEK de tipo 2 es trametinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto adicional de esta realización, el sujeto con cáncer tiene una mutación somática de RAS o BRAF. Tal como se usa en el presente documento, "mutación somática" significa un cambio que se produce en cualquier célula que no está destinada a convertirse en una célula germinal. La mutación puede ser, por ejemplo, una sustitución, delección, inserción o fusión. Preferiblemente, la mutación de RAS es una mutación en H-RAS, N-RAS o K-RAS. Las siguientes tablas 1, 2 y 3 muestran los SEQ ID NO. de secuencias representativas de ácidos nucleicos y aminoácidos de H-RAS, K-RAS y N-RAS de tipo natural de diversos animales, respectivamente. Estas secuencias pueden usarse en métodos para identificar sujetos con un genotipo RAS mutante (tal como en los métodos

expuestos a continuación).

Tabla 1. Secuencias de H-RAS

SEQ NO.	ID	polipéptido o secuencia de ácido nucleico	Organismo	Otra información
1		ácido nucleico	humano	isoforma 1
2		Polipéptido	humano	isoforma 1
3		ácido nucleico	humano	isoforma 2
4		Polipéptido	humano	isoforma 2
5		ácido nucleico	humano	isoforma 3
6		Polipéptido	humano	isoforma 3
7		ácido nucleico	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	variante 1
8		Polipéptido	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	variante 1
9		ácido nucleico	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	variante 2
10		Polipéptido	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	variante 2
11		ácido nucleico	ratón <i>Mus musculus</i>	
12		Polipéptido	ratón <i>Mus musculus</i>	
13		ácido nucleico	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 1
14		Polipéptido	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 1
15		ácido nucleico	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 2
16		Polipéptido	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 2
17		ácido nucleico	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 3
18		polipéptido	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 3
19		ácido nucleico	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 4
20		Polipéptido	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 4
21		ácido nucleico	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante 1
22		Polipéptido	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante 1
23		ácido nucleico	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante 2
24		Polipéptido	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante 2
25		ácido nucleico	gato, <i>Felis catus</i>	variante 1
26		Polipéptido	gato, <i>Felis catus</i>	variante 1
27		ácido nucleico	gato, <i>Felis catus</i>	variante 2
28		Polipéptido	gato, <i>Felis catus</i>	variante 2
29		ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante 1
30		Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante 1
31		ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante 2
32		Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante 2
33		ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X1

ES 2 953 311 T3

34	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X1
35	ácido nucleico	pollo, <i>Gallus gallus</i>	
36	Polipéptido	pollo, <i>Gallus gallus</i>	

Tabla 2. Secuencias de K-RAS

SEQ NO.	ID	polipéptido o secuencia de ácido nucleico	Organismo	Otra información
37		ácido nucleico	humano	isoforma a
38		Polipéptido	humano	isoforma a
39		ácido nucleico	humano	isoforma b
40		Polipéptido	humano	isoforma b
41		ácido nucleico	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	
42		Polipéptido	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	
43		ácido nucleico	ratón <i>Mus musculus</i>	
44		Polipéptido	ratón <i>Mus musculus</i>	
45		ácido nucleico	conejo, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
46		Polipéptido	conejo, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
47		ácido nucleico	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 1
48		Polipéptido	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 1
49		ácido nucleico	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 2
50		Polipéptido	conejillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante 2
51		ácido nucleico	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante 1
52		Polipéptido	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante 1
53		ácido nucleico	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante 2
54		Polipéptido	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante 2
55		ácido nucleico	gato, <i>Felis catus</i>	variante 1
56		Polipéptido	gato, <i>Felis catus</i>	variante 1
57		ácido nucleico	gato, <i>Felis catus</i>	variante 2
58		Polipéptido	gato, <i>Felis catus</i>	variante 2
59		ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	
60		Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	
61		ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X2
62		Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X2
63		ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X3
64		Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X3
65		ácido nucleico	pollo, <i>Gallus gallus</i>	
66		Polipéptido	pollo, <i>Gallus gallus</i>	

Tabla 3 Secuencias de N-RAS

SEQ NO.	ID	polipéptido o secuencia de ácido nucleico	Organismo	Otra información
---------	----	---	-----------	------------------

67	ácido nucleico	humano	
68	Polipéptido	humano	
69	ácido nucleico	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	
70	Polipéptido	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	
71	ácido nucleico	ratón <i>Mus musculus</i>	
72	Polipéptido	ratón <i>Mus musculus</i>	
73	ácido nucleico	conejiillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	
74	Polipéptido	conejiillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	
75	ácido nucleico	conejiillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante X1
76	Polipéptido	conejiillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	variante X1
77	ácido nucleico	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	
78	Polipéptido	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	
79	ácido nucleico	gato, <i>Felis catus</i>	
80	Polipéptido	gato, <i>Felis catus</i>	
81	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	
82	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	
83	ácido nucleico	pollo, <i>Gallus gallus</i>	
84	Polipéptido	pollo, <i>Gallus gallus</i>	

La siguiente tabla 4 muestra los SEQ ID NO. de secuencias representativas de ácidos nucleicos y aminoácidos de BRAF de tipo natural de diversos animales. Estas secuencias de tipo natural pueden usarse en métodos (tales como los métodos expuestos a continuación) para identificar sujetos con un genotipo BRAF mutante.

Tabla 4. Secuencias de BRAF

SEQ ID NO.	Ácido nucleico o polipéptido	Organismo	Otra información
85	ácido nucleico	humano	
86	Polipéptido	humano	
87	ácido nucleico	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	
88	Polipéptido	rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	
89	ácido nucleico	ratón <i>Mus musculus</i>	
90	Polipéptido	ratón <i>Mus musculus</i>	
91	ácido nucleico	conejo, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
92	Polipéptido	conejo, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
93	ácido nucleico	conejiillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	
94	Polipéptido	conejiillo de Indias, <i>Cavia porcellus</i>	
95	ácido nucleico	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante x1
96	Polipéptido	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante x1
97	ácido nucleico	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante x2
98	Polipéptido	perro, <i>Canis lupus familiaris</i>	variante x2
99	ácido nucleico	gato, <i>Felis catus</i>	
100	Polipéptido	gato, <i>Felis catus</i>	
101	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X1

102	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X1
103	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X2
104	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X2
105	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X3
106	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X3
107	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X4
108	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X4
109	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X5
110	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X5
111	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X6
112	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X6
113	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X7
114	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X7
115	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X8
116	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X8
117	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X9
118	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X9
119	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X10
120	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X10
121	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X11
122	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante X11
123	ácido nucleico	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante 2
124	Polipéptido	vaca, <i>Bos taurus</i>	variante 2
125	ácido nucleico	caballo, <i>Equus caballus</i>	
126	Polipéptido	caballo, <i>Equus caballus</i>	
127	ácido nucleico	pollo, <i>Gallus gallus</i>	
128	Polipéptido	pollo, <i>Gallus gallus</i>	

Los métodos para identificar mutaciones en ácidos nucleicos, tales como los genes RAS y BRAF identificados anteriormente, se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse de muestras biológicas. En la presente divulgación, las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, orina, piel, saliva y biopsias. Las muestras biológicas se obtienen de un sujeto mediante procedimientos y métodos de rutina que se conocen en la técnica.

5

Los ejemplos no limitativos de métodos para identificar mutaciones incluyen PCR, secuenciación, captura híbrida, captura en disolución, sondas de inversión molecular, ensayo de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), y combinaciones de los mismos.

10

En la técnica se conocen diversos métodos de secuenciación. Estos incluyen, pero no se limitan a, la secuenciación de Sanger (también conocida como secuenciación didesoxilo) y diversos métodos de secuenciación por síntesis (SBS) tal como se describe en, por ejemplo, Metzker 2005, secuenciación por hibridación, por ligamiento (por ejemplo, el documento WO 2005021786), por degradación (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5,622,824 y 6,140,053) y secuenciación de nanoporos (que está disponible comercialmente de Oxford Nanopore Technologies, RU). En las técnicas de secuenciación profunda, un nucleótido determinado de la secuencia se lee más de una vez durante el proceso de secuenciación. Las técnicas de secuenciación profunda se describen en, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 20120264632 y la publicación de patente internacional n.º WO2012125848.

15

Los métodos basados en PCR para detectar mutaciones se conocen en la técnica y emplean amplificación por PCR, donde cada secuencia diana en la muestra tiene un par correspondiente de cebadores específicos de secuencia únicos. Por ejemplo, el método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) permite la detección rápida de mutaciones después de que las secuencias genómicas

20

se amplifican mediante PCR. La mutación se discrimina por digestión con endonucleasas de restricción específicas y se identifica mediante electroforesis. Véase, por ejemplo, Ota *et al.*, 2007. Las mutaciones también pueden detectarse mediante PCR en tiempo real. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud internacional n.º WO2012046981.

5 Los métodos de captura de híbridos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 20130203632 y las patentes estadounidenses n.ºs 8.389.219 y 8.288.520. Estos métodos se basan en la hibridación selectiva de las regiones genómicas diana con oligonucleótidos diseñados por el usuario. La hibridación puede ser con oligonucleótidos inmovilizados en micromatrices de alta o baja densidad (captura en matriz), o hibridación en fase de disolución con oligonucleótidos modificados con un ligando (por ejemplo, biotina) que posteriormente puede inmovilizarse en una superficie sólida, tal como una perla (captura en disolución).

15 Las técnicas de sonda de inversión molecular (MIP) se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Absalan *et al.*, 2008. Este método usa moléculas MIP, que son sondas de “candado” especiales (Nilsson *et al.*, 1994) para el genotipado. Una molécula MIP es un oligonucleótido lineal que contiene regiones específicas, secuencias universales, sitios de restricción y una secuencia Tag (índice) (16-22 pb). Un MIP hibrida directamente alrededor del marcador genético/SNP de interés. El método MIP también puede usar una serie de conjuntos de sondas de “candado” que se hibridan con el ADN genómico en paralelo (Hardenbol *et al.*, 2003). En caso de una coincidencia perfecta, las regiones de homología genómica se ligan invirtiendo la configuración (tal como sugiere el nombre de la técnica) y creando una molécula circular. Después de la primera restricción, todas las moléculas se amplifican con cebadores universales. Los amplicones se restringen nuevamente para garantizar fragmentos cortos para la hibridación en una micromatriz. Los fragmentos cortos generados se marcan y, a través de una secuencia Tag, se hibridan con una cTag (cadena complementaria para el índice) en una matriz. Después de la formación del dúplex Tag-cTag, se detecta una señal.

20 En otro aspecto de esta realización, el método comprende además administrar al sujeto al menos un agente terapéutico adicional eficaz para tratar o mejorar los efectos del cáncer. El agente terapéutico adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento del mismo, un agente citotóxico, una toxina, un radionúclido, un inmunomodulador, un agente terapéutico fotoactivo, un agente radiosensibilizador, una hormona, un agente antiangiogénico y combinaciones de los mismos.

25 Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo” abarca inmunoglobulinas que se producen de manera natural así como inmunoglobulinas que no se producen de manera natural, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Los fragmentos de anticuerpos incluyen aquellos que se unen al antígeno, (por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y rIgG). Véase también, por ejemplo, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 3.<sup>a</sup> ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998)). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. El término “anticuerpo” incluye además anticuerpos policlonales y monoclonales.

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en la presente divulgación incluyen rituximab (Rituxan), cetuximab (Erbix), bevacizumab (Avastin) e ibritumomab (Zevalin).

30 Los agentes citotóxicos según la presente divulgación incluyen agentes que dañan el ADN, antimetabolitos, agentes antimicrotúbulos, agentes antibióticos, etc. Los agentes que dañan el ADN incluyen agentes alquilantes, agentes basados en platino, agentes intercalantes e inhibidores de la replicación del ADN. Los ejemplos no limitativos de agentes alquilantes de ADN incluyen ciclofosfamida, mecloretamina, uramustina, melfalán, clorambucilo, ifosfamida, carmustina, lomustina, estreptozocina, busulfano, temozolomida, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, profármacos y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de agentes basados en platino incluyen cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, satraplatino, tetranitrato de triplatino, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, profármacos y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de agentes intercalantes incluyen doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina, mitoxantrona, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, profármacos y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de la replicación del ADN incluyen irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, profármacos y combinaciones de los mismos. Los antimetabolitos incluyen antagonistas de folato tales como metotrexato y premetrexed, antagonistas de purina como 6-mercaptopurina, dacarbazina y fludarabina, y antagonistas de pirimidina como 5-fluorouracilo, arabinosilcitosina, capecitabina, gemcitabina, decitabina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, profármacos y combinaciones de los mismos. Los agentes antimicrotúbulos incluyen, sin limitación, alcaloides de la vinca, paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>) e ixabepilona (Ixempra<sup>®</sup>). Los agentes antibióticos incluyen, sin limitación, actinomicina, antraciclinas, valrubicina, epirubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, profármacos y combinaciones de los mismos.

Los agentes citotóxicos según la presente divulgación también incluyen un inhibidor de la ruta PI3K/Akt. Los ejemplos no limitativos de un inhibidor de la ruta PI3K/Akt según la presente divulgación incluyen A-674563 (n.º de CAS 552325-73-2), AGL 2263, AMG-319 (Amgen, Thousand Oaks, CA), AS-041164 (5-benzo[1,3]dioxol-5-

ilmetileno-tiazolidina-2,4-diona), AS-604850 (5-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona), AS-605240 (5-quinoxilina-6-metileno-1,3-tiazolidina-2,4-diona), AT7867 (n.º de CAS 857531-00-1), serie de bencimidazol, Genentech (Roche Holdings Inc., South San Francisco, CA), BML-257 (n.º de CAS 32387-96-5), CAL-120 (Gilead Sciences, Foster City, CA), CAL-129 (Gilead Sciences), CAL-130 (Gilead Sciences), CAL-253 (Gilead Sciences), CAL-263 (Gilead Sciences), n.º de CAS 612847-09-3, n.º de CAS 681281-88-9, n.º de CAS 75747-14-7, n.º de CAS 925681-41-0, n.º de CAS 98510-80-6, CCT128930 (n.º de CAS 885499-61-6), CH5132799 (n.º de CAS 1007207-67-1), CHR-4432 (Chroma Therapeutics, Ltd., Abingdon, RU), FPA 124 (n.º de CAS 902779-59-3), GS-1101 (CAL-101) (Gilead Sciences), GSK 690693 (n.º de CAS 937174-76-0), H-89 (n.º de CAS 127243-85-0), Honokiol, IC87114 (Gilead Science), IPI-145 (Intellikine Inc.), KAR-4139 (Karus Therapeutics, Chilworth, RU), KAR-4141 (Karus Therapeutics), KIN-1 (Karus Therapeutics), KT 5720 (n.º de CAS 108068-98-0), miltefosina, diclorhidrato de MK-2206 (n.º de CAS 1032350-13-2), ML-9 (n.º de CAS 105637-50-1), clorhidrato de naltrindol, OXY-111A (NormOxys Inc., Brighton, MA), perifosina, PHT-427 (n.º de CAS 1191951-57-1), inhibidor de PI3 cinasa delta, Merck KGaA (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ), inhibidor de PI3 cinasa delta, Genentech (Roche Holdings Inc.), inhibidor de PI3 cinasa delta, Incozen (Incozen Therapeutics, Pvt. Ltd., Hyderabad, India), inhibidores-2 de PI3 cinasa delta, Incozen (Incozen Therapeutics), inhibidor de PI3 cinasa, Roche-4 (Roche Holdings Inc.), inhibidores de PI3 cinasa, Roche (Roche Holdings Inc.), inhibidores de PI3 cinasa, Roche-5 (Roche Holdings Inc.), inhibidores de PI3-alfa/delta, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd., South San Francisco, CA), inhibidores de PI3-delta, Cellzome (Cellzome AG, Heidelberg, Alemania), inhibidores de PI3-delta, Intellikine (Intellikine Inc., La Jolla, CA), inhibidores de PI3-delta, Pathway Therapeutics-1 (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidores de PI3-delta, Pathway Therapeutics-2 (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidores de PI3-delta/gamma, Cellzome (Cellzome AG), inhibidores de PI3-delta/gamma, Cellzome (Cellzome AG), inhibidores de PI3-delta/gamma, Intellikine (Intellikine Inc.), inhibidores de PI3-delta/gamma, Intellikine (Intellikine Inc.), PI3-delta/gamma, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidores de PI3-delta/gamma, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidor de PI3-gamma Evotec (Evotec), inhibidor de PI3-gamma, Cellzome (Cellzome AG), PI3 -inhibidores gamma, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidores PI3K delta/gamma, Intellikine-1 (Intellikine Inc.), inhibidores PI3K delta/gamma, Intellikine-1 (Intellikine Inc.), pictilisib (Roche Holdings Inc.), PIK-90 (n.º de CAS 677338-12-4), SC-103980 (Pfizer, Nueva York, NY), SF-1126 (Semafore Pharmaceuticals, Indianapolis, IN), SH-5, SH-6, tetrahidrocurcumina, TG100-115 (Targegen Inc., San Diego, CA), triciribina, X-339 (Xcovery, West Palm Beach, FL), XL-499 (Evotech, Hamburgo, Alemania), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

En la presente divulgación, el término “toxina” significa un veneno antigénico o veneno de origen vegetal o animal. Un ejemplo es la toxina diftérica o porciones de la misma.

En la presente divulgación, el término “radionúclido” significa una sustancia radiactiva administrada al paciente, por ejemplo, por vía intravenosa u oral, después de lo cual penetra a través del metabolismo normal del paciente en el órgano o tejido diana, donde administra radiación local durante un breve periodo de tiempo. Los ejemplos de radionucleidos incluyen, pero no se limitan a, I-125, At-211, Lu-177, Cu-fi7, I-131, Sm-153, Re-186, P-32, Re-188, In-114m e Y-90.

En la presente divulgación, el término “inmunomodulador” significa una sustancia que altera la respuesta inmunitaria aumentando o reduciendo la capacidad del sistema inmunitario para producir anticuerpos o células sensibilizadas que reconocen y reaccionan con el antígeno que inició su producción. Los inmunomoduladores pueden ser preparaciones recombinantes, sintéticas o naturales e incluyen citocinas, corticosteroides, agentes citotóxicos, timosina e inmunoglobulinas. Algunos inmunomoduladores están naturalmente presentes en el cuerpo y algunos de ellos están disponibles en preparaciones farmacológicas. Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferones, imiquimod y fracciones de membrana celular de bacterias, IL-2, IL-7, IL-12, CCL3, CCL26, CXCL7, y citosina fosfato-guanosina sintética (CpG).

En la presente divulgación, el término “agente terapéutico fotoactivo” significa compuestos y composiciones que se activan tras la exposición a la luz. Se describen determinados ejemplos de agentes terapéuticos fotoactivos, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 2011/0152230 A1, “Photoactive Metal Nitrosyls For Blood Pressure Regulation And Cancer Therapy”.

En la presente divulgación, el término “agente radiosensibilizador” significa un compuesto que hace que las células tumorales sean más sensibles a la radioterapia. Los ejemplos de agentes radiosensibilizadores incluyen misonidazol, metronidazol, tirapazamina y crocetinato de sodio trans.

En la presente divulgación, el término “hormona” significa una sustancia liberada por las células de una parte del cuerpo que afecta a las células de otra parte del cuerpo. Los ejemplos de hormonas incluyen, pero no se limitan a, prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxano, amilina, hormona antimulleriana, adiponectina, hormona adrenocorticotrópica, angiotensinógeno, angiotensina, vasopresina, atriopéptina, péptido natriurético cerebral, calcitonina, colecistoquinina, hormona liberadora de corticotropina, encefalina, endotelina, eritropoyetina, galanina, gastrina, grelina, glucagón, hormona liberadora de gonadotropina, hormona liberadora de hormona del crecimiento, hormona liberadora de hormona del crecimiento, lactógeno placentario humano, inhibina, insulina, somatomedina, leptina, liptropina, hormona luteinizante, hormona estimulante de melanocitos, motilina, orexina, oxitocina, polipéptido pancreático, hormona paratiroidea, prolactina, hormona liberadora de prolactina, relaxina, renina,

secretina, somatostatina, trombopoyetina, hormona estimulante de la tiroides, testosterona, dehidroepiandrosterona, androstenediona, dihidrotestosterona, aldosterona, estradiol, estrona, estriol, cortisol, progesterona, calcitriol y calcidiol.

5 Algunos compuestos interfieren con la actividad de determinadas hormonas o detienen la producción de determinadas hormonas. Estos compuestos que interfieren con las hormonas incluyen, pero no se limitan a, tamoxifeno (Nolvadex<sup>®</sup>), anastrozol (Arimidex<sup>®</sup>), letrozol (Femara<sup>®</sup>), y fulvestrant (Faslodex<sup>®</sup>). Tales compuestos también están dentro del significado de hormona en la presente divulgación.

10 Tal como se usa en el presente documento, un agente “antiangiogénesis” significa una sustancia que reduce o inhibe el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, tal como, por ejemplo, un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y un inhibidor de la migración de células endoteliales. Los agentes antiangiogénicos incluyen, sin limitación, 2-metoxiestradiol, angiostatina, bevacizumab, factor inhibidor de la angiogénesis derivado del cartílago, endostatina, IFN- $\alpha$ , IL-12, itraconazol, linomida, factor plaquetario 4, prolactina, SU5416, suramina, tasquinimod, tecogalan, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina, trombospondina, TNP-470, ziv-aflibercept, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, profármacos y combinaciones de los mismos.

15 En otro aspecto de esta realización, la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo. Tal como se usa en el presente documento, “sinérgico” significa más que aditivo. Los efectos sinérgicos pueden medirse mediante diversos ensayos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no se limita a, los descritos en el presente documento, tal como el ensayo de exceso sobre Bliss.

20 Otra realización de la presente divulgación es un método para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto que lo necesita. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es trametinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar o mejorar los efectos del cáncer.

25 Los sujetos adecuados y preferidos y los diversos tipos de cáncer son los dados a conocer en el presente documento. En esta realización, los métodos pueden usarse para tratar los cánceres descritos anteriormente, incluyendo aquellos cánceres con antecedentes mutacionales identificados anteriormente. Los métodos para identificar tales mutaciones también son tal como se establecieron anteriormente.

30 En un aspecto de esta realización, el BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional de esta realización, el trametinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en forma de una composición farmacéutica que comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 En un aspecto adicional de esta realización, el método comprende además administrar al sujeto al menos un agente terapéutico adicional, preferiblemente un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto de esta realización, la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo.

40 Una realización adicional de la presente divulgación es un método para efectuar la muerte de células cancerosas. El método comprende poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK de tipo 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 Los inhibidores de MEK de tipo 2 adecuados y preferidos son los descritos en el presente documento. En esta realización, la muerte de células cancerosas puede lograrse en células cancerosas que tienen diversos antecedentes mutacionales y/o que se caracterizan tal como se describió anteriormente. Los métodos para identificar tales mutaciones también son tal como se establecieron anteriormente.

50 En un aspecto de esta realización, la célula cancerosa es una célula cancerosa de mamífero. Preferiblemente, la célula cancerosa de mamífero se obtiene de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en seres humanos, primates, animales de granja y animales domésticos. Más preferiblemente, la célula cancerosa de mamífero es una célula cancerosa humana.

Los métodos de esta realización, que pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*, puede usarse para efectuar la muerte de células cancerosas, por ejemplo, destruir células cancerosas, en células de los tipos de cáncer descritos en el presente documento.

En un aspecto adicional de esta realización, el método comprende además poner en contacto la célula cancerosa con al menos un agente terapéutico adicional, preferiblemente un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como se describe en el presente documento.

5 En otro aspecto de esta realización, poner en contacto la célula cancerosa con los agentes anticancerígenos primero y segundo proporciona un efecto sinérgico en comparación con poner en contacto la célula cancerosa con cualquier agente anticancerígeno solo. En esta realización, "poner en contacto" significa acercar BVD-523 y los inhibidores de MEK de tipo 2 y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales a las células cancerosas. Esto puede lograrse usando técnicas convencionales de administración de fármacos a mamíferos o en el *in vitro* situación, por ejemplo, proporcionar BVD-523 y los inhibidores de MEK de tipo 2 y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos a un medio de cultivo en el que se localizan las células cancerosas.

10 Una realización adicional de la presente divulgación es un kit para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto que lo necesita. El kit comprende una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK de tipo 2 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, envasados junto con instrucciones para su uso.

15 Los kits también pueden incluir recipientes de almacenamiento adecuados, por ejemplo, ampollas, viales, tubos, etc., para cada agente anticancerígeno de la presente divulgación (que, por ejemplo, puede estar en forma de composiciones farmacéuticas) y otros reactivos, por ejemplo, tampones, soluciones salinas equilibradas, etc., para su uso en la administración de agentes anticancerígenos a sujetos. Los agentes anticancerígenos de la divulgación y otros reactivos pueden estar presentes en los kits en cualquier forma conveniente, tal como, por ejemplo, en una disolución o en forma de polvo. Los kits pueden incluir además un recipiente de envasado, que tiene opcionalmente una o más particiones para alojar la composición farmacéutica y otros reactivos opcionales.

20 En esta realización, los sujetos e inhibidores de MEK de tipo 2 adecuados y preferidos son tal como se establecieron anteriormente. En esta realización, el kit puede usarse para tratar los cánceres descritos anteriormente, incluyendo los cánceres con antecedentes mutacionales identificados en el presente documento. Los métodos para identificar tales mutaciones son tal como se establecieron anteriormente.

25 En un aspecto de esta realización, el kit comprende además al menos un agente terapéutico adicional, preferiblemente un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como se describe en el presente documento.

30 En otro aspecto de esta realización, la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo.

35 Otra realización de la presente divulgación es una composición farmacéutica para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto que lo necesita. La composición farmacéutica comprende un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK de tipo 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo.

40 Los sujetos y los inhibidores de MEK de tipo 2 adecuados y preferidos son los descritos en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden usarse para tratar los cánceres descritos anteriormente, incluidos aquellos cánceres con antecedentes mutacionales identificados en el presente documento. Los métodos para identificar tales mutaciones también son tal como se establecieron anteriormente.

45 En un aspecto adicional de esta realización, la composición farmacéutica comprende además al menos un agente terapéutico adicional, preferiblemente un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como se describe en el presente documento.

50 Las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación pueden estar en una forma de dosificación unitaria que comprende ambos agentes anticancerígenos. En otro aspecto de esta realización, el primer agente anticancerígeno está en una primera forma de dosificación unitaria y el segundo agente anticancerígeno está en una segunda forma de dosificación unitaria, separada de la primera.

55 Los agentes anticancerígenos primero y segundo pueden administrarse conjuntamente al sujeto, o bien simultáneamente o bien en momentos diferentes, según lo considere más apropiado un médico. Si los agentes anticancerígenos primero y segundo se administran en momentos diferentes, por ejemplo, mediante administración en serie, el primer agente anticancerígeno puede administrarse al sujeto antes que el segundo agente anticancerígeno. Alternativamente, el segundo agente anticancerígeno puede administrarse al sujeto antes que el primer agente anticancerígeno.

Una realización adicional de la presente divulgación es un método para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto que lo necesita. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de (i) un primer agente

- anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK seleccionado del grupo formado por antroquinonol (Golden Biotechnology), AS-1940477 (Astellas), AS-703988 (Merck KGaA), BI-847325 (Boehringer Ingelheim), E-6201 (Eisai), GDC-0623 (Hoffmann-La Roche), GDC-0973, RG422, RO4987655, RO5126766, SL327, WX-554 (Wilex),
- 5 polipéptido YopJ, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos, para tratar o mejorar los efectos del cáncer.
- Los sujetos adecuados y preferidos son los descritos en el presente documento. En esta realización, los métodos pueden usarse para tratar los cánceres descritos anteriormente, incluyendo aquellos cánceres con antecedentes mutacionales identificados anteriormente. Los métodos para identificar dichas mutaciones también son tal como se
- 10 establecieron anteriormente.
- En un aspecto adicional de esta realización, el método comprende además administrar al sujeto al menos un agente terapéutico adicional, preferiblemente un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como se describe en el presente documento.
- En otro aspecto de esta realización, la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un
- 15 efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo.
- Una realización adicional de la presente divulgación es un método para efectuar la muerte de células cancerosas. El método comprende poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK seleccionado del grupo formado por antroquinonol (Golden
- 20 Biotechnology), AS-1940477 (Astellas), AS-703988 (Merck KGaA), BI-847325 (Boehringer Ingelheim), E-6201 (Eisai), GDC-0623 (Hoffmann-La Roche), GDC-0973, RG422, RO4987655, RO5126766, SL327, WX-554 (Wilex), polipéptido YopJ, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.
- En esta realización, los métodos pueden usarse para efectuar la muerte celular en cualquiera de los cánceres descritos anteriormente, incluyendo aquellos cánceres con antecedentes mutacionales identificados en el presente
- 25 documento. Los métodos para identificar dichas mutaciones también son tal como se establecieron anteriormente.
- En un aspecto de esta realización, la célula cancerosa es una célula cancerosa de mamífero. Preferiblemente, la célula cancerosa de mamífero se obtiene de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en seres humanos, primates, animales de granja y animales domésticos. Más preferiblemente, la célula cancerosa de mamífero es una célula cancerosa humana.
- En otro aspecto de esta realización, el método comprende además poner en contacto la célula cancerosa con al
- 30 menos un agente terapéutico adicional, preferiblemente un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como se describe en el presente documento.
- En otro aspecto de esta realización, poner en contacto el cáncer con los agentes anticancerígenos primero y
- 35 segundo proporciona un efecto sinérgico en comparación con poner en contacto la célula cancerosa con cualquier agente anticancerígeno solo. En esta realización, "poner en contacto" significa acercar BVD-523 y los inhibidores de MEK y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales a las células cancerosas. Esto puede lograrse usando técnicas convencionales de administración de fármacos a mamíferos o en la situación *in vitro*, por ejemplo, proporcionar BVD-523 y los inhibidores de MEK, y opcionalmente otros agentes terapéuticos a un medio de cultivo en el que se localizan las células cancerosas.
- Los métodos de esta realización, que pueden llevarse a cabo *in vitro* o *en vivo*, pueden usarse para efectuar la
- 40 muerte de células cancerosas, por ejemplo, destruir células cancerosas, en células de los tipos de cáncer descritos en el presente documento.
- Otra realización de la presente divulgación es un kit para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto que
- 45 lo necesita. El kit comprende una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK seleccionado del grupo que consiste en antroquinonol (Golden Biotechnology), AS-1940477 (Astellas), AS-703988 (Merck KGaA), BI-847325 (Boehringer Ingelheim), E-6201 (Eisai), GDC-0623 (Hoffmann-La Roche), GDC-0973, RG422, RO4987655, RO5126766, SL327, WX-554 (Wilex), polipéptido YopJ, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos, envasados junto con instrucciones para su uso.
- Los sujetos adecuados y preferidos son los descritos en el presente documento. En esta realización, el kit puede
- 50 usarse para tratar los cánceres descritos anteriormente, incluyendo los cánceres con antecedentes mutacionales identificados en el presente documento. Los métodos para identificar tales mutaciones también son tal como se establecieron anteriormente.
- En otro aspecto de esta realización, el kit comprende además al menos un agente terapéutico adicional,
- 55 preferiblemente un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto de esta realización, la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo.

Una realización adicional de la presente divulgación es una composición farmacéutica para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto que lo necesita. La composición farmacéutica comprende un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK seleccionado del grupo que consiste en antroquinonol (Golden Biotechnology), AS-1940477 (Astellas), AS-703988 (Merck KGaA), BI-847325 (Boehringer Ingelheim), E-6201 (Eisai), GDC-0623 (Hoffmann-La Roche), GDC-0973, RG422, RO4987655, RO5126766, SL327, WX-554 (Wilex), polipéptido YopJ, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos, en los que la administración del primer y segundo agentes anticancerígenos proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo.

Los sujetos adecuados y preferidos son los descritos en el presente documento. En esta realización, la composición farmacéutica puede usarse para tratar los cánceres descritos anteriormente, incluyendo aquellos cánceres con antecedentes mutacionales identificados en el presente documento. Los métodos para identificar tales mutaciones también son tal como se establecieron anteriormente.

En otro aspecto de esta realización, la composición farmacéutica comprende además al menos un agente terapéutico adicional, preferiblemente un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como se describe en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas según esta realización pueden estar en una forma de dosificación unitaria que comprende ambos agentes anticancerígenos. En otro aspecto de esta realización, el primer agente anticancerígeno está en una primera forma de dosificación unitaria y el segundo agente anticancerígeno está en una segunda forma de dosificación unitaria, separada de la primera.

Los agentes anticancerígenos primero y segundo pueden administrarse conjuntamente al sujeto, o bien simultáneamente o bien en momentos diferentes, según lo considere más apropiado un médico. Si los agentes anticancerígenos primero y segundo se administran en momentos diferentes, por ejemplo, mediante administración en serie, el primer agente anticancerígeno puede administrarse al sujeto antes que el segundo agente anticancerígeno. Alternativamente, el segundo agente anticancerígeno puede administrarse al sujeto antes que el primer agente anticancerígeno.

En la presente divulgación, una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto o composición dados a conocer en el presente documento es una cantidad de dicho compuesto o composición que es suficiente para lograr los resultados beneficiosos o deseados tal como se describe en el presente documento cuando se administra a un sujeto. Las formas de dosificación eficaces, los modos de administración y las cantidades de dosificación pueden determinarse empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la experiencia en la técnica. Los expertos en la técnica entienden que la cantidad de dosificación variará con la vía de administración, la tasa de excreción, la duración del tratamiento, la identidad de cualquier otro fármaco que se administre, la edad, el tamaño y la especie de mamífero, por ejemplo, paciente humano, y factores similares bien conocidos en las técnicas de la medicina y la medicina veterinaria. En general, una dosis adecuada de una composición según la descripción será aquella cantidad de la composición que sea la dosis más baja eficaz para producir el efecto deseado. La dosis eficaz de un compuesto o composición de la presente divulgación puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día.

Un ejemplo no limitativo adecuado de una dosificación de un agente anticancerígeno dado a conocer en el presente documento es de desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 2400 mg/kg por día, tal como de desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 1200 mg/kg por día, de 75 mg/kg por día a aproximadamente 300 mg/kg por día, incluyendo de desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg por día. Otras dosificaciones representativas de tales agentes incluyen aproximadamente 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600 mg/kg, 700 mg/kg, 800 mg/kg, 900 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg, 1900 mg/kg, 2000 mg/kg, 2100 mg/kg, 2200 mg/kg y 2300 mg/kg por día. La dosis eficaz de un agente anticancerígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, BVD-523 y un inhibidor de MEK, puede administrarse en dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día.

Los agentes anticancerígenos o las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse de cualquier manera deseada y eficaz: para ingestión oral, o como pomada o gota para administración local en los ojos, o para administración parenteral u otra administración de cualquier manera apropiada. tales como intraperitoneal, subcutánea, tópica, intradérmica, por inhalación, intrapulmonar, rectal, vaginal, sublingual, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal o intralinfática. Además, los agentes anticancerígenos o las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse junto con otros tratamientos. Si se

desea, los agentes anticancerígenos o las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden encapsularse o protegerse de otro modo contra secreciones gástricas u otras.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación comprenden uno o más principios activos, por ejemplo, agentes anticancerígenos, mezclados con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más compuestos, fármacos, componentes y/o materiales. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los agentes/compuestos de la presente divulgación se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* (21ª edición, Lippincott Williams and Wilkins, Filadelfia, PA).

Los diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* (21ª edición, Lippincott Williams and Wilkins, Filadelfia, PA.) y *The National Formulary* (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.)) e incluyen azúcares (por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol), almidones, preparaciones de celulosa, fosfatos de calcio (por ejemplo, fosfato de dicalcio, fosfato de tricalcio e hidrogenofosfato de calcio), citrato de sodio, agua, disoluciones acuosas (por ejemplo, solución salina, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de Ringer lactato), alcoholes (por ejemplo, alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol bencílico), polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), ésteres orgánicos (por ejemplo, oleato de etilo y triglicéridos), polímeros biodegradables (por ejemplo, poliláctido-poliglicólido, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos)), matrices elastoméricas, liposomas, microesferas, aceites (por ejemplo, maíz, germen de trigo, oliva, ricino, sésamo, semilla de algodón y cacahuete), manteca de cacao, ceras (por ejemplo, ceras para supositorios), parafinas, siliconas, talco, silicatos, etc. Cada diluyente o portador farmacéuticamente aceptable usado en una composición farmacéutica de la divulgación debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no perjudicial para el sujeto. Los diluyentes o portadores adecuados para una forma de dosificación seleccionada y la vía de administración pretendida se conocen bien en la técnica, y los diluyentes o portadores aceptables para una forma de dosificación y método de administración elegidos pueden determinarse usando conocimientos ordinarios en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden, opcionalmente, contener componentes y/o materiales adicionales comúnmente usados en composiciones farmacéuticas. Estos componentes y materiales se conocen bien en la técnica e incluyen (1) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, glicolato de almidón de sodio, carboximetilcelulosa de sodio reticulada y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos y laurilsulfato de sodio; (10) agentes de suspensión, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto; (11) agentes amortiguadores; (12) excipientes, tales como lactosa, azúcares de leche, polietilenglicoles, grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, manteca de cacao, almidones, tragacanto, derivados de la celulosa, polietilenglicol, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco, salicilato, óxido de zinc, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida; (13) diluyentes inertes, tales como agua u otros disolventes; (14) conservantes; (15) agentes tensioactivos; (16) agentes dispersantes; (17) agentes retardadores de la absorción o de liberación controlada, tales como hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, polímeros biodegradables, liposomas, microesferas, monoestearato de aluminio, gelatina y ceras; (18) agentes opacificantes; (19) adyuvantes; (20) agentes humectantes; (21) agentes emulsionantes y de suspensión; (22), solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, de semilla de algodón, cacahuete, maíz, aceites de germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano; (23) propelentes, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano; (24) antioxidantes; (25) agentes que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario previsto, tales como azúcares y cloruro de sodio; (26) agentes espesantes; (27) materiales de recubrimiento, tales como lecitina; y (28) agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Cada componente o material debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no perjudicial para el sujeto. Los componentes y materiales adecuados para una forma de dosificación seleccionada y una vía de administración pretendida se conocen bien en la técnica, y los componentes y materiales aceptables para una forma de dosificación y un método de administración elegidos pueden determinarse usando conocimientos ordinarios en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos, una disolución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, un aceite en agua o emulsión líquida de agua en aceite, un elixir o jarabe, una pastilla, un bolo, un electuario o una pasta. Estas formulaciones pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de recubrimiento en bombo, mezclado, granulación o

liofilización.

5 Pueden prepararse formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, pastillas, grageas, polvos, gránulos y similares), por ejemplo, mezclando el/los principio(s) activo(s) con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, una o más cargas, extensores, aglutinantes, humectantes, agentes disgregantes, agentes retardadores de la disolución, aceleradores de la absorción, agentes humectantes, absorbentes, lubricantes y/o agentes colorantes. Pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar tales como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando un excipiente adecuado. Un comprimido puede elaborarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse usando un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante, tensoactivo o agente dispersante adecuados. Los comprimidos moldeados pueden elaborarse moldeándolos en una máquina adecuada. Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, pastillas y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del componente activo que contienen. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el componente activo solo, o preferiblemente, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. El componente activo también puede estar en forma microencapsulada.

20 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes adecuados comúnmente usados en la técnica. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más principios activos con uno o más diluyentes o portadores no irritantes adecuados que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a temperatura corporal y, por tanto, se derretirá en el recto o en la cavidad vaginal y liberará el compuesto activo. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables que se sabe que son apropiados en la técnica.

30 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas e inhalantes. El/los agente(s)/compuesto(s) activo(s) puede(n) mezclarse en condiciones estériles con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adecuado. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener excipientes. Los polvos y aerosoles pueden contener excipientes y propulsores.

35 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más agentes/compuestos en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes adecuados, tampones, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, o agentes de suspensión o espesantes. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensoactivos. Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener adyuvantes adecuados, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción.

40 En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco (por ejemplo, formulación farmacéutica), es deseable retardar su absorción por inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del agente activo/fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de un agente/fármaco administrado por vía parenteral puede lograrse disolviendo o suspendiendo el agente/fármaco activo en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables pueden fabricarse formando matrices de microcápsulas del componente activo en polímeros biodegradables. Dependiendo de la razón del componente activo con respecto al polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del componente activo. Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

60 Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas

y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere sólo la adición del diluyente o portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

## 5 Ácido nucleico

“Ácido nucleico” u “oligonucleótido” o “polinucleótido” usados en el presente documento significan al menos dos nucleótidos unidos covalentemente. Pueden usarse muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo propósito que un ácido nucleico dado. Por tanto, un ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos.

- 10 Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener porciones de secuencias tanto bicatenarias como monocatenarias. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse como una molécula monocatenaria o expresarse en una célula (*in vitro* o *in vivo*) usando un gen sintético. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.

- 20 Un ácido nucleico generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque pueden incluirse análogos de ácidos nucleicos que pueden tener al menos un enlace diferente, por ejemplo, enlaces de fosoramidato, fosfortioato, fosforditioato u O-metilfosforoamidita y estructuras y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas; estructuras principales no iónicas y estructuras principales sin ribosa, incluyendo los dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.235.033 y 5.034.506. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más nucleótidos que se producen de manera no natural o modificados también se incluyen dentro de la definición de ácido nucleico.

- 25 Una molécula de ácido nucleico es “complementaria” de otra molécula de ácido nucleico si se hibrida con la segunda molécula de ácido nucleico, aunque se permite cierto nivel de discordancia. La hibridación puede tener lugar en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad moderada o alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad adecuadas están determinadas, en general, por la longitud de las moléculas de ácido nucleico, el grado de complementación y otros factores fácilmente comprensibles por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, por ejemplo, para la selección preliminar, las condiciones de baja rigurosidad, tales como una temperatura de aproximadamente 48 a aproximadamente 55 °C, en un tampón que incluye aproximadamente 5x SSC, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,5 % de SDS y de aproximadamente el 0 a aproximadamente el 30 % de formamida. Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada pueden ser a una temperatura de aproximadamente 60 °C en un tampón que incluye de aproximadamente 5x a aproximadamente 6x SSC, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,5 % de SDS y de aproximadamente el 40 % de formamida. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad pueden ser a una temperatura de aproximadamente 65 °C en un tampón que incluye de aproximadamente 5x a aproximadamente 6x SSC, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,5 % de SDS y de aproximadamente el 50 % de formamida. En algunas realizaciones, las condiciones de alta rigurosidad son tal como se describen en el presente documento o son, por ejemplo, condiciones que permiten una hibridación comparable con la hibridación que se produce usando una sonda de ADN de al menos 500 nucleótidos de longitud, en un tampón que contiene NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M, pH 7,2, 7 % de SDS, EDTA 1 mM y 1 % de BSA (fracción V), a una temperatura de 65 °C, o un tampón que contenga el 48 % de formamida, 4,8x SSC, Tris-Cl 0,2 M, pH 7,6, 1x disolución de Denhardt, el 10 % de sulfato de dextrano y el 0,1 % de SDS, a una temperatura de 42 °C.

- 45 Las hibridaciones pueden llevarse a cabo durante un periodo de aproximadamente 20 a 30 minutos, o de aproximadamente 2 a 6 horas, o de aproximadamente 10 a 15 horas, o durante 24 horas o más. También se confía en la hibridación de alta rigurosidad para el éxito de numerosas técnicas realizadas de forma rutinaria por biólogos moleculares, tales como PCR de alta rigurosidad, secuenciación de ADN, análisis de polimorfismos conformacionales monocatenarios e hibridación *in situ*. Por el contrario con las hibridaciones de tipo Northern y tipo Southern, estas técnicas generalmente se realizan con sondas relativamente cortas (por ejemplo, generalmente de aproximadamente 15 nucleótidos o más para PCR o secuenciación y de aproximadamente 40 nucleótidos o más para hibridación *in situ*).

- 55 Una sonda o cebador es una molécula de ADN o ARN monocatenario (por ejemplo, un oligonucleótido) de secuencia definida que puede aparearse con una segunda molécula de ADN o ARN que contiene una secuencia complementaria (la diana). La estabilidad de la molécula híbrida resultante depende de la extensión del apareamiento de bases que se produce y se ve afectada por parámetros tales como el grado de complementariedad entre la sonda y la molécula diana y el grado de rigurosidad de las condiciones de hibridación. El grado de rigurosidad de la hibridación se ve afectado por parámetros tales como la temperatura, la concentración de sal y la concentración de moléculas orgánicas, tales como la formamida, y se determina mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las sondas o cebadores específicos para las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento, o partes de las mismas, pueden variar en longitud en cualquier número entero desde al menos 8 nucleótidos hasta más de 500 nucleótidos, incluyendo cualquier valor intermedio, según el propósito para el cual y

las condiciones bajo las cuales, se usa la sonda o el cebador. Por ejemplo, una sonda o cebador puede tener 8, 10, 15, 20 o 25 nucleótidos de longitud, o puede tener al menos 30, 40, 50 o 60 nucleótidos de longitud, o puede tener más de 100, 200, 500 o 1000 nucleótidos de longitud. Las sondas o cebadores específicos para las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden tener una identidad de secuencia superior al 55-75 %, o al menos una identidad de secuencia del 75-85 %, o una identidad de secuencia de al menos el 85-99 %, o una identidad de secuencia del 100 % con respecto a las secuencias de ácido descritas en el presente documento.

Las sondas o cebadores pueden derivarse de un gen, segmento cromosómico o cromosoma que se usa como referencia, por ejemplo, en la detección de varianza para determinar si una muestra de prueba del mismo gen, segmento cromosómico o cromosoma derivado de un individuo en particular contiene la secuencia idéntica o una secuencia diferente en una o más posiciones de nucleótidos. Las sondas pueden derivarse de ADN genómico o ADNc, por ejemplo, mediante amplificación, o de segmentos de ADN clonados, y pueden contener secuencias de ADN genómico o ADNc que representan la totalidad o una parte de un solo gen de un solo individuo. Las sondas o los cebadores pueden sintetizarse químicamente.

Las sondas o los cebadores pueden marcarse de manera detectable, o bien de manera radiactiva o bien no radiactiva, mediante métodos que son conocidos por los expertos en la técnica.

La presente invención proporciona combinaciones que han demostrado mejorar el efecto de BVD-523. En el presente documento, los solicitantes también han demostrado que la combinación de BVD-523 con diferentes inhibidores de MEK (es decir, trametinib, MEK162 y GDC-0623) es sinérgica.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Las líneas de células cancerosas se mantuvieron en cultivo celular en medios convencionales y condiciones de suero. Para los estudios de aumento de la dosis, las células A375 se dividieron, se cultivaron hasta una confluencia de aproximadamente el 40-60 % y luego se trataron con la dosis inicial del fármaco especificado. La tabla 5 muestra un resumen de los tratamientos farmacológicos que se aumentaron.

Tabla 5 - Resumen de los tratamientos que se aumentan

Tratamiento	Inhibidor
1	Trametinib (MEKi)
2	Dabrafenib (BRAFi)
3	BVD-523 (ERKi)
4	Dabrafenib (BRAFi) + Trametinib (MEKi)
5	Dabrafenib (BRAFi) + BVD-523 (ERKi)
6	Trametinib (MEKi) + BVD-523 (ERKi)

Se realizaron aumentos de la dosis de un solo agente basándose en Little *et al.*, 2011 y se describe en la figura 19. A continuación, se permitió que las células crecieran hasta una confluencia del 70-90 % y se dividieron. Las razones de desdoblamiento se mantuvieron lo más "normales" posible y razonablemente uniformes entre los tratamientos (por ejemplo, un mínimo del 50 % de la razón de desdoblamiento normal de los parentales). El medio se renovó cada 3-4 días. Cuando las células alcanzaron de nuevo una confluencia de aproximadamente el 40-60 %, se aumentó la dosis. En el caso de que se pasara por alto la ventana del 40-60 %, las células se dividieron de nuevo y se dosificaron una vez que alcanzaron una confluencia del 40-60 %. De nuevo, el medio se renovó cada 3-4 días. El procedimiento se repitió según se requería (figura 19).

Para los tratamientos con un solo agente, las concentraciones iniciales y los aumentos de dosis se realizaron comenzando con la  $CI_{50}$  aproximada, aumentando en pequeños incrementos o, suavemente, para las 4-5 dosis iniciales, duplicando la dosis, aumentando en el mismo incremento para las siguientes 4 dosis, luego moviéndose a aumentos de 1,5 veces en la concentración para las dosis posteriores.

Para los tratamientos combinados, las concentraciones iniciales y los aumentos de dosis se realizaron comenzando con la mitad de la  $CI_{50}$  aproximada de cada compuesto (el ensayo de combinación sugiere que esto dará como resultado un intervalo de inhibición de aproximadamente el 40-70 %), aumentando según los agentes individuales (es decir, haciendo una duplicación inicial y luego aumentando en el mismo incremento para las siguientes 4 dosis, luego pasando a aumentos de concentración de 1,5 veces). La tabla 6 muestra los aumentos de dosis proyectados

usando estos esquemas.

Tabla 6 - Aumentos de dosis proyectados - Mes 1

Dosis				Dab/Tram		Dab/523		Tram/523	
	Tram (nM)	Dab (nM)	BVD-523 ( $\mu$ M)	Dab (nM)	Tram (nM)	Dab (nM)	523 ( $\mu$ M)	Tram (nM)	523 ( $\mu$ M)
1	1	5	0,16	2,5	0,5	2,5	0,08	0,5	0,08
2	2	10	0,32	5	1	5	0,16	1	0,16
3	3	15	0,48	7,5	1,5	7,5	0,24	1,5	0,24
4	4	20	0,64	10	2	10	0,32	2	0,32
5	5	25	0,80	12,5	2,5	12,5	0,40	2,5	0,40
6	8	38	1,2	19	4	19	0,6	4	0,6
7	11	56	1,8	28	6	28	0,9	6	0,9
8	17	84	2,7	42	8	42	1,4	8	1,4
9	25	127	4,1	63	13	63	2,0	13	2,0
10	38	190	6,1	95	19	95	3,0	19	3,0
11	57	285	9,1	142	28	142	4,6	28	4,6
12	85	427	13,7	214	43	214	6,8	43	6,8
13	128	641	20,5	320	64	320	10,3	64	10,3
14	192	961	30,8	481	96	481	15,4	96	15,4
15	288	1442	46,1	721	144	721	23,1	144	23,1
16	432	2162	69,2	1081	216	1081	34,6	216	34,6
17	649	3244	103,8	1622	324	1622	51,9	324	51,9
18	973	4865	155,7	2433	487	2433	77,8	487	77,8
19	1460	7298	233,5	3649	730	3649	116,8	730	116,8
20	2189	10947	350,3	5474	1095	5474	175,2	1095	175,2

Las poblaciones de células resistentes clonales se derivaron de grupos de células resistentes mediante dilución limitante.

- 5 Se usaron ensayos de proliferación para rastrear los cambios en la sensibilidad al/a los agente(s) intensificado(s) en intervalos de tiempo apropiados (por ejemplo, cada mes, aunque el tiempo depende de que haya suficientes números de celdas disponibles). Para los ensayos de proliferación, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 3000 células por pocillo en medio DMEM sin fármaco que contenía FBS al 10 % y se dejaron adherir durante la noche antes de añadir el compuesto o el control de vehículo. Los compuestos se prepararon a partir de disoluciones madre de DMSO para dar un intervalo de concentración final tal como se muestra en las figuras 2A-H. La concentración final de DMSO fue constante al 0,1 %. Los compuestos de prueba se incubaron con las células durante 96 horas a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Luego se añadió Alamar Blue al 10 % (v/v) y se incubó durante 4 horas y se detectó el producto fluorescente usando un lector de placas BMG FLUOstar. Se dedujo el valor de fondo promedio sólo de los medios y se analizaron los datos usando una ecuación logística de 4 parámetros en GraphPad Prism. Paclitaxel se usó como control positivo.

Los ensayos de proliferación para el mes 1 se iniciaron el día 28 usando células que crecían en las concentraciones de cada agente indicadas en la tabla 7.

Tabla 7 - Concentraciones iniciales de fármacos utilizados en los ensayos de proliferación - Mes 1

Línea	Dab	Tram	BVD-523
Parental	-	-	-
Tram	-	2 nM	-
Dab	15 nM	-	-

## ES 2 953 311 T3

BVD-523	-	-	0,48 $\mu$ M
Tram + Dab	5 nM	1 nM	-
Dab + BVD-523	7,5 nM	-	0,24 $\mu$ M
Tram + BVD-523	-	1 nM	0,16 $\mu$ M

Los ensayos de proliferación para el mes 2 se iniciaron el día 56 usando células que crecían en las concentraciones de cada agente indicadas en la tabla 8.

Tabla 8 - Concentraciones iniciales de fármacos usados en los ensayos de proliferación - Mes 2

Línea	Dab	Tram	BVD-523
Parental	-	-	-
Tram	-	8 nM	-
Dab	127 nM	-	-
BVD-523	-	-	0,8 $\mu$ M
Tram + Dab	10 nM	2 nM	-
Dab + BVD-523	12,5 nM	-	0,4 $\mu$ M
Tram + BVD-523	-	2 nM	0,32 $\mu$ M

5 Al final del periodo de aumento de 3 meses, los cultivos se mantuvieron en la concentración máxima durante 2 semanas antes de la ronda final de ensayos de proliferación y posible clonación de células individuales. Dado que los ensayos de proliferación/clonación de células individuales requerían células en proliferación activa, para los tratamientos en los que las células proliferaban muy lentamente a la concentración máxima o que sólo aumentaron recientemente, también se mantuvo un cultivo de respaldo a una concentración más baja (tabla 9). Para el tratamiento con BVD-523, donde las células parecían haber dejado de crecer casi por completo y parecían particularmente frágiles en la concentración máxima (1,8  $\mu$ M), los cultivos se mantuvieron en una concentración más baja durante el periodo de 2 semanas.

Tabla 9 - Detalles de los tratamientos que se cultivan a una concentración fija durante 2 semanas

Tratamiento	Inhibidor	Cultivo 1	Cultivo de respaldo
1	Tram	160 nM	80 nM
2	Dab	3,2 $\mu$ M	-
3	BVD-523	1,2 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M
4	Dab + Tram	D: 160 nm	D: 80 nm
		T: 30 nm	T: 16 nm
5	Dab + BVD-523	D: 42 nm	D: 28 nm
		523: 1,4 $\mu$ M	523: 0,9 $\mu$ M
6	Tram + BVD-523	T: 4 nm	T: 2,5 nm
		523: 0,6 $\mu$ M	523: 0,4 $\mu$ M

Los ensayos de proliferación para el mes 3 usaron células que crecían en las concentraciones de cada agente indicadas en la tabla 10.

15 Tabla 10 - Concentraciones iniciales de fármacos usados en los ensayos de proliferación - Mes 3

Línea	Dab	Tram	BVD-523
Parental	-	-	-
Tram	-	160 nM	-
Dab	3,2 $\mu$ M	-	-
BVD-523	-	-	1,2 $\mu$ M

Tram + Dab	80 nM	16 nM	-
Dab + BVD-523	28 nM	-	0,9 μM
Tram + BVD-523	-	2,5 nM	0,4 μM

Para los estudios de combinación, se sembraron células A375 (ATCC) en placas de 96 pocillos por triplicado a una densidad celular de 3000 células/pocillo en DMEM más FBS al 10 % y se dejaron adherir durante la noche antes de añadir el compuesto de prueba o el control de vehículo. Las combinaciones se sometieron a prueba usando una matriz de dosis de 10x8 con una concentración final de DMSO del 0,2 %. Siguió un periodo de incubación del ensayo de 96 horas, con la adición posterior de Alamar Blue al 10 % (v/v) y 4 horas de incubación antes de la lectura en un lector de placas fluorescentes. Después de leer Alamar Blue, la mezcla de medio/Alamar Blue se agitó y se añadieron 100 μl de CellTiter-Glo/PBS (1:1) y las placas se procesaron según las instrucciones del fabricante (Promega). Sólo se restaron los valores de fondo de los medios antes de analizar los datos. Luego se aplicó el modelo de aditividad de Bliss.

En resumen, los valores de inhibición fraccional pronosticados para la inhibición combinada se calcularon usando la ecuación  $C_{bliss} = A + B - (A \times B)$  donde A y B son las inhibiciones fraccionarias obtenidas por el fármaco A solo o el fármaco B solo en concentraciones específicas.  $C_{bliss}$  es la inhibición fraccional que se esperaría si la combinación de los dos fármacos fuera exactamente aditiva. Los valores de  $C_{bliss}$  se restan de los valores de inhibición fraccional observados experimentalmente para dar un valor de "exceso sobre Bliss". Los valores de exceso sobre Bliss superiores a 0 indican sinergia, mientras que los valores inferiores a 0 indican antagonismo. Los valores de exceso sobre Bliss se representan gráficamente como mapas de calor ± DE.

Los datos individuales y de combinación también se presentan como curvas de dosis-respuesta generadas en GraphPad Prism (se representan gráficamente usando el % de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO).

Para los estudios de combinación enfocados, los ensayos de viabilidad de Alamar Blue se realizaron tal como se describió anteriormente para los estudios de combinación. Además, se realizaron ensayos Caspase-Glo 3/7. En resumen, las células HCT116 se sembraron por triplicado en placas blancas de 96 pocillos a una densidad celular de 5000 células/pocillo en 5A de McCoy más FBS al 10 %. Se sembraron células A375 a una densidad de 5000 células/pocillo en DMEM más FBS al 10 %. Se permitió que las células se adhirieran durante la noche antes de la adición del compuesto de prueba o el control de vehículo. La concentración final de DMSO fue del 0,2 % y se incluyó estaurosporina 800 nM como control positivo. Se usaron periodos de incubación de ensayo de 24 y 48 horas. Luego, se añadió Caspase-Glo® 3/7 50 % (v/v), las placas se mezclaron durante 5 minutos en un agitador orbital y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la lectura en un lector de placas luminiscente. Sólo se restaron los valores de fondo de los medios antes de analizar los datos.

Ejemplo 2

Ensayos de aumento de la dosis y proliferación - Mes 1

Progreso de aumento de la dosis - Mes 1

Se aumentó la dosis de células A375 usando BVD-523, dabrafenib y trametinib como agentes únicos o en combinación. Las dosis se aumentaron en pequeños incrementos durante el primer mes. Aparte de una marcada reducción en la tasa de crecimiento, las células generalmente toleraron bien los aumentos y se planeó aumentar las dosis de manera más agresiva usando incrementos más grandes en el mes 2. Las figuras 1A-C muestran el progreso del mes 1 para los estudios de aumento de la dosis.

Resultados del ensayo de proliferación - Mes 1

Se realizaron ensayos de proliferación para evaluar la respuesta de las líneas celulares aumentada frente a la línea celular parental a los tratamientos con BVD-523, dabrafenib y trametinib.

Las figuras 2A-H muestran los resultados del ensayo de proliferación sin procesar y normalizados del mes 1 de los estudios. Obsérvese que las diferencias en las señales máximas en los controles de DMSO entre diferentes tratamientos (figuras 2D-F, 2H) sugieren tasas de crecimiento diferenciales entre tratamientos. Estas diferencias pueden influir en las respuestas de las líneas a los inhibidores en los ensayos de proliferación.

La tabla 11 muestra los datos de  $CI_{50}$  para el mes 1 de los estudios.

Tabla 11 – Datos de  $CI_{50}$  - Mes 1

Compuesto	Línea celular, $CI_{50}$ relativa (nM)					
	Par *	Tram	Dab	BVD-52 3	Dab/Tram	Dab/52 3

Dabrafenib	6	29	aproximadamente 1161	8	58	68	11
Trametinib	0,5	2,2	2,5	0,7	3,9	3,1	2,5
BVD-523	189	335	350	268	300	412	263
Paclitaxel	2,2	3,0	3,3	3,4	3,5	3,4	3,4

\*Par = línea celular parental

Hubo indicios tempranos de que las células que se hicieron crecer en presencia de aumentos de la dosis de dabrafenib o trametinib, o bien como agentes únicos o bien en combinación, mostraban respuestas disminuidas a estos dos agentes en los ensayos de proliferación.

- 5 En las primeras etapas del mes 2, la tasa de crecimiento de las células en el tratamiento con dabrafenib sólo aumentó notablemente en relación con las primeras etapas del mes 1. Esto permitió una mayor tasa de progresión y sugirió que la resistencia se estaba haciendo evidente.

Ejemplo 3

Ensayos de aumento de la dosis y proliferación - Mes 2

10 Progreso de aumento de la dosis - Mes 2

En el segundo mes de estudios, la mayoría de los tratamientos pasaron a una fase en la que las dosis se aumentaron en incrementos mayores (1,5 veces) en comparación con la fase inicial de aumento suave. El aumento de agente único de dabrafenib y trametinib fue el más rápido, con células que crecieron en concentraciones equivalentes a 100x  $CI_{50}$  de células parentales (figuras 3A, B). El aumento de agente único de BVD-523 progresó más lentamente en comparación con dabrafenib y trametinib (figura 3C). Véase la figura 3D para una comparación de los aumentos de un solo agente. Las células aumentadas de BVD-523 tenían un aspecto más "frágil" y había un mayor número de células flotantes en comparación con las poblaciones aumentadas de dabrafenib y trametinib.

Los aumentos de agentes combinados progresaron más lentamente que los tratamientos con un solo agente. La combinación BVD-523/trametinib fue particularmente eficaz para evitar que las células progresen.

20 Resultados del ensayo de proliferación - Mes 2

Los ensayos de proliferación en poblaciones celulares aumentadas de dabrafenib y trametinib como agente único revelaron cambios modestos en las curvas de respuesta a la dosis, lo que sugiere que un periodo adicional de aumento sería beneficioso para enriquecer adicionalmente las células resistentes. Curiosamente, en el ensayo de proliferación, hubo pruebas que sugerían que las células expuestas a BVD-523 crecían menos tras la retirada del inhibidor, lo que quizás indica un nivel de adicción.

Las figuras 4A-H muestran los resultados del ensayo de proliferación sin procesar y normalizados del mes 2 de los estudios. Obsérvese que las diferencias en las señales máximas en los controles de DMSO entre diferentes tratamientos (figuras 4D-F, 4H) sugieren tasas de crecimiento diferenciales entre tratamientos. Estas diferencias pueden influir en las respuestas de las líneas a los inhibidores en los ensayos de proliferación.

- 30 Las figuras 5A-H muestran los resultados del ensayo de proliferación sin procesar y normalizados del mes 2 de los estudios con un enfoque sólo en los datos de la línea parental y BVD-523.

La tabla 12 muestra datos de  $CI_{50}$  para el mes 2 de los estudios. Las  $CI_{50}$  relativas se determinaron a partir de ajustes de curvas de 4 parámetros en Prism.

Tabla 12 – Datos de  $CI_{50}$  - Mes 2

Compuesto	Línea celular, $CI_{50}$ relativa (nM)						
	Par*	Tra	Dab	BVD-523	Dab/Tram	Dab/523	Tram/523
Dabrafenib	4,1	6,2	11,5	697	256	218	68
Trametinib	0,4	0,7	1,1	24,3	12,6	6,2	4,6
BVD-523	187	252	284	1706	561	678	435
Paclitaxel	3,7	8,9	1,9	6,5	4,7	4,2	8,9

- 35 \*Par = línea celular parental

Ejemplo 4Ensayos de aumento de la dosis y proliferación - Mes 3Progreso de aumento de la dosis - Mes 3

Las figuras 6A-C muestran el aumento de agente único y combinado para el mes 3 de los estudios. La figura 6D muestra una comparación de aumentos de un solo agente.

5 Resultados del ensayo de proliferación - Mes 3

La figura 7 muestra una evaluación del crecimiento durante el ensayo de proliferación en pocillos de control de DMSO. Las figuras 8A-D muestran los resultados del mes 3 de los estudios. Las figuras 9A-D muestran los resultados del mes 3 de los estudios con un enfoque en líneas celulares de tratamiento único.

10 La tabla 13 muestra datos de  $CI_{50}$  para el mes 3 de los estudios. Las  $CI_{50}$  relativas se determinaron a partir de ajustes de curvas de 4 parámetros en Prism. Los valores de  $CI_{50}$  no se determinaron para la línea celular aumentada con trametinib debido a la falta de crecimiento durante el ensayo (ND: no realizado).

Tabla 13 – Datos de  $CI_{50}$  - Mes 3

Compuesto	Línea celular, $CI_{50}$ relativa (nM)						
	Par *	Tram	Dab	BVD-52 3	Dab/Tram	Dab/523	Tram/523
Dabrafenib	2,1	ND	2,5	18,4	17,9	337	73
Trametinib	0,2	ND	0,4	1,7	2,7	90	11,2
BVD-523	129	ND	198	433	323	1151	296
Paclitaxel	1,9	ND	1,9	6,5	4,7	4,2	8,9

\*Par = línea celular parental

Ejemplo 515 Resultados del estudio de combinación

Tal como se esperaba, las células A375, que portan una mutación BRAF (V600E), fueron sensibles a dabrafenib. Los valores de  $CI_{50}$  de agente único calculados usando Alamar Blue (figuras 10, 12, 14) fueron generalmente ligeramente más bajos para dabrafenib y BVD-523 en comparación con los derivados usando CellTiter-Glo (figuras 11, 13, 15). Los valores de  $CI_{50}$  de dabrafenib y trametinib en un ensayo CellTiter-Glo de 72 horas fueron  $28 \pm 16$  nM y  $5 \pm 3$  nM respectivamente (Greger *et al.*, 2012; Rey *et al.*, 2013) - los resultados del agente único informados en este caso son coherentes con estos valores. Hubo alguna evidencia de una ventana de sinergia en todos los tratamientos. La variación entre los triplicados fue baja; sin embargo, hubo algunas pruebas de efectos de borde que probablemente explican el aumento aparente del crecimiento observado en algunos tratamientos en comparación con el control sin fármaco (por ejemplo, particularmente evidente en la combinación trametinib/BVD-523). Esto hace que la interpretación del análisis de Bliss sea más desafiante, ya que en algunos tratamientos puede haber dado como resultado una mejora artificial en el nivel de sinergia.

25 Los ensayos de combinación se repitieron para las células A375. Las potencias de agente único BVD-523, trametinib y dabrafenib fueron coherentes con las informadas en los estudios previos.

30 Las células HCT116 son células de cáncer colorrectal humano con mutaciones en KRAS. Dabrafenib y trametinib fueron antagonistas en concentraciones objetivo relevantes. Por el contrario, trametinib mostró sinergia con AZ628 en una amplia gama de combinaciones y con concentraciones más altas de sorafenib. BVD-523 presentó ventanas de sinergia tanto con AZ628 como con sorafenib.

En las células A375, trametinib presentó focos de sinergia a concentraciones más bajas de dabrafenib y AZ628. BVD-523 presentó una ventana de sinergia con las concentraciones más bajas de sorafenib.

35 Ejemplo 6BVD-523 alteró los marcadores de actividad MAPK cinasa y función efectora

40 Para los estudios de inmunotransferencia de tipo Western, las células HCT116 ( $5 \times 10^6$ ) se sembraron en placas de 10 cm en 5A de McCoy más FBS al 10 %. Se sembraron células A375 ( $2,5 \times 10^6$ ) en placas de 10 cm en DMEM más FBS al 10 %. Se permitió que las células se adhirieran durante la noche antes de la adición de la cantidad indicada de compuesto de ensayo (BVD-523) o control de vehículo. Las células se trataron durante o bien 4 o bien 24 horas antes del aislamiento de los lisados de proteínas de células completas, tal como se especifica a continuación. Las células se recogieron mediante tripsinización, se sedimentaron y se congelaron instantáneamente. Los lisados se prepararon con tampón RIPA (ensayo de radioinmunoprecipitación), se aclararon mediante

centrifugación y se cuantificaron mediante ensayo de ácido biconínico (BCA). Se resolvieron 20-50 µg de proteína mediante electroforesis SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se sometieron a prueba usando los anticuerpos detallados en la tabla 14 (para el tratamiento de 4 horas) y la tabla 15 (para el tratamiento de 24 horas) a continuación.

5 Tabla 14 - Detalles de anticuerpos

Antígeno	Tamaño (kDa)	Proveedor	N.º de cat.	Dilución	Condiciones de incubación/bloqueo	Secundario
pRSK1/2	90	Célula	9335	1:1000	durante la noche 4°C 5%	anti-conejo
PS380		Señalización			BSA	
pRSK1/2 pS380	90	Señalización celular	11989	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
pRSK-T359/S363	90	Millipore	04-419	1:40000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
RSK total	90	Señalización celular	9333	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
pErk 1/2	42/44	Señalización celular	9106S	1:500	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-ratón
ERK total	42/44	Señalización celular	9102	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-conejo
pMEK1/2	45	Señalización celular	9154	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
MEK totales	45	Señalización celular	9126	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
pS6-pS235	32	Señalización celular	2211S	1:3000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-conejo
S6 total	32	Señalización celular	2217	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-conejo
DUSP6	48	Señalización celular	3058S	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
CRAF total	73	BD Biociencias	61015 2	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-ratón
pCRAF-Ser338	73	Señalización celular	9427	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
PRB (Ser780)	105	Señalización celular	9307	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
β-actina	42	Sigma	A5441	1:500.000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-ratón

Tabla 15 - Detalles de anticuerpos

Antígeno	Tamaño (kDa)	proveedor	N.º de cat.	Dilución	Condiciones de incubación/bloqueo	Secundario
PRB (Ser780)	105	Señalización celular	9307	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
CCND1	34	Abcam	ab6152	1:500	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-ratón
Bim-EL	23	Millipore	AB1700 3	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
Bim-EL	23	Señalización celular	2933	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
BCL-xL	30	Señalización celular	2762	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo

PARP	116/ 89	Señalización celular	9542	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-conejo
Caspasa escindida 3	17,1 9	Señalización celular	9664X	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-conejo
DUSP6	48	Señalización celular	3058S	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
pRSK1/2 pS380	90	Señalización celular	9335	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
pRSK1/2 pS380	90	Señalización celular	11989	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
pRSK-T359/S36 3	90	Millipore	04-419	1:40000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
RSK total	90	Señalización celular	9333	1:1000	durante la noche 4°C 5 % de BSA	anti-conejo
pErk 1/2	42/4 4	Señalización celular	9106S	1:500	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-ratón
ERK total	42/4 4	Señalización celular	9102	1:2000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-conejo
$\beta$ -actina	42	Sigma	A5441	1:500.000	durante la noche 4°C 5 % de leche	anti-ratón

Las figuras 16-18 muestran análisis de inmunotransferencia de tipo Western de células tratadas con BVD-523 a diversas concentraciones para lo siguiente: 1) componentes de señalización de MAPK en células A375 después de 4 horas; 2) ciclo celular y señalización de apoptosis en A375 24 horas de tratamiento con diversas cantidades de BVD-523; y 3) señalización de MAPK en células HCT-116 tratadas durante 4 horas. Los resultados muestran que el tratamiento agudo y prolongado con BVD-523 en células cancerosas mutantes RAF y RAS *in vitro* afecta tanto a la fosforilación del sustrato como a las dianas efectoras de las cinasas ERK. Las concentraciones de BVD-523 necesarias para inducir estos cambios suelen estar en el intervalo micromolar bajo.

Los cambios en varios marcadores de actividad específicos son dignos de mención. En primer lugar, la abundancia de isoformas de migración lenta de la cinasa ERK aumenta después del tratamiento con BVD-523; pueden observarse cambios moderados de forma aguda y aumento después de un tratamiento prolongado. Si bien esto podría indicar un aumento en las formas fosforiladas y enzimáticamente activas de ERK, sigue siendo digno de mención que múltiples proteínas sujetas a la regulación directa e indirecta por ERK permanecen "apagadas" después del tratamiento con BVD-523. En primer lugar, las proteínas RSK1/2 muestran una fosforilación reducida en residuos que dependen estrictamente de ERK para la modificación de proteínas (T359/S363). En segundo lugar, el tratamiento con BVD-523 induce cambios complejos en la fosfatasa de retroalimentación de MAPK, DUSP6: las isoformas de proteínas que migran lentamente se reducen después del tratamiento agudo, mientras que los niveles de proteínas totales se reducen considerablemente después del tratamiento prolongado con BVD-523. Ambos hallazgos son coherentes con la actividad reducida de las cinasas ERK, que controlan la función DUSP6 a través de mecanismos postraduccionales y transcripcionales. En general, a pesar de los aumentos en las formas celulares de ERK que normalmente se cree que son activas, parece probable que la actividad de la enzima ERK celular se inhiba por completo después del tratamiento agudo o prolongado con BVD-523.

Coherente con estas observaciones, los genes efectoras que requieren la señalización de la ruta de MAPK se alteran después del tratamiento con BVD-523. El aparato del ciclo celular G1/S está regulado tanto a nivel postraduccionales como transcripcional mediante la señalización de MAPK, y los niveles de proteína ciclina-D1 se reducen considerablemente después del tratamiento prolongado con BVD-523. De manera similar, la expresión génica y la abundancia de proteínas de los efectoras de la apoptosis a menudo requieren una señalización de MAPK intacta, y los niveles totales de Bim-EL aumentan después del tratamiento prolongado con BVD-523. Sin embargo, tal como se indicó anteriormente, la escisión de la proteína PARP y el aumento de la apoptosis no se observaron en el fondo de células A375; esto sugiere que factores adicionales pueden influir en si los cambios en la señalización del efector dependiente de BVD-523/ERK se traducen en acontecimientos definitivos, tales como muerte celular y detención del ciclo celular.

Coherente con la actividad celular de BVD-523, el análisis de marcadores sugiere que la inhibición de ERK altera una variedad de acontecimientos de señalización molecular en las células cancerosas, haciéndolas susceptibles tanto a la disminución de la proliferación celular como a la supervivencia.

En suma, las figuras 16-18 muestran que BVD-523 inhibe la ruta de señalización de MAPK y puede ser más favorable en comparación con la inhibición de RAF o MEK en este contexto.

Finalmente, las propiedades de BVD-523 pueden hacer de este un agente preferido para su uso como inhibidor de ERK, en comparación con otros agentes con una actividad similar. Se sabe que los fármacos inhibidores de cinasas muestran interacciones únicas y específicas con sus enzimas dianas, y que la eficacia del fármaco está fuertemente influenciada tanto por el modo de inhibición directa como por la susceptibilidad a los cambios adaptativos que se producen después del tratamiento. Por ejemplo, los inhibidores de las cinasas ABL, KIT, EGFR y ALK son eficaces sólo cuando su diana afín se encuentra en configuraciones activas o inactivas. Del mismo modo, algunos de estos inhibidores son especialmente sensibles a la mutación genética secundaria o a los cambios adaptativos postraduccionales de la proteína diana. Finalmente, los inhibidores de RAF muestran una potencia diferencial frente a las cinasas RAF presentes en determinados complejos proteicos y/o localizaciones subcelulares. En resumen, tal como se sabe que las cinasas ERK existen en estados bioquímicos diversos, variables y complejos, parece probable que BVD-523 pueda interactuar e inhibir estas dianas de una manera distinta y altamente preferible a otros agentes.

Ejemplo 7

Estudios de cultivos celulares de inhibidores de MEK y ERK

Ensayo de proliferación de agente único

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a las densidades y condiciones de los medios indicadas en la tabla 16 y se dejaron adherir durante la noche antes de la adición del control del compuesto o del vehículo. Los compuestos se prepararon a partir de reservas de DMSO para dar las concentraciones finales deseadas. La concentración final de DMSO fue constante al 0,1 %. Los compuestos de prueba se incubaron con las células durante 72 horas a 37 °C, el 5 % de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Se añadió reactivo CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante y se detectó la luminiscencia usando el lector de placas BMG FLUOstar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Se dedujo el valor de fondo promedio solo de los medios y se analizaron los datos usando una ecuación logística de 4 parámetros en GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Ensayo de proliferación de combinación

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos por triplicado a las densidades y condiciones de los medios indicadas en la tabla 16 y se dejaron adherir durante la noche antes de la adición del compuesto o control del vehículo. Los compuestos se prepararon a partir de reservas de DMSO para dar las concentraciones finales deseadas. La concentración final de DMSO fue constante al 0,2 %. Las combinaciones se sometieron a prueba usando una matriz de dosis de 10 x 8 o una matriz de dosis de 10 x 6. Los compuestos de prueba se incubaron con las células durante 72 horas a 37 °C, el 5 % de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Se añadió CellTiter-Glo® reactivo (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante y se detectó la luminiscencia usando el lector de placas BMG FLUOstar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Se dedujo el valor de fondo promedio solo de los medios y se analizaron los datos.

Las interacciones de combinación en la matriz de dosis se determinaron mediante los modelos de independencia de Bliss y aditividad de Loewe usando software de análisis de combinación Chalice™ (Horizon Discovery Group, Cambridge, MA) tal como se describe en el manual del usuario (disponible en [chalice.horizondiscovery.com/chalice-portal/documentation/analyzer/home.jsp](http://chalice.horizondiscovery.com/chalice-portal/documentation/analyzer/home.jsp)). La sinergia se determina comparando el nivel de inhibición observado experimentalmente en cada punto de combinación con el valor esperado para la aditividad, que se deriva de las respuestas de un solo agente a lo largo de los bordes de la matriz. Las posibles interacciones sinérgicas se identificaron mostrando el exceso de inhibición calculado sobre el previsto como aditivo en la matriz de dosis como un mapa de calor, y reportando una "puntuación de sinergia" cuantitativa basada en el modelo de Loewe. Los datos del agente único derivados de las placas de ensayo combinadas se presentaron como curvas de dosis-respuesta generadas en GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) (representadas gráficamente usando el porcentaje de viabilidad en relación con los controles tratados sólo con DMSO).

Tabla 16 - Densidad de siembra de líneas celulares y medios de crecimiento

Línea celular	Densidad de siembra (células/pocillo)	Medios
HCT116 Parental	1000	5A de McCoy + 10 % de FBS
HCT116 KRAS KO (+/-)	2000	5A de McCoy + 10 % de FBS
RKO Parental	2000	5A de McCoy + 10 % de FBS
RKO BRAF KO (+/-/-)	2000	5A de McCoy + 10 % de FBS
A375 Parental	2000	DMEM + 10 % de FBS
A375 NRAS (Q61 K/+/+)	2000	DMEM + 10 % de FBS
G-361	5000	5A de McCoy + 10 % de FBS
A549	750	RPMI 1640 + 10 % de FBS

H2212	4000	RPMI 1640 + 10 % de FBS
H1437	1500	RPMI 1640 + 10 % de FBS
H226	750	RPMI 1640 + 10 % de FBS

### Resultados

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos sobre la viabilidad celular de combinar inhibidores de ERK con inhibidores de MEK en un panel de líneas celulares de cáncer isogénicas y no isogénicas (tabla 17).

Tabla 17 - Descripción de las líneas celulares estudiadas

Línea celular	Tipo de cáncer	Descripción
HCT116 Parental	CDN	Células parentales heterocigotas que contienen un alelo KRAS mutante (G13D) y un alelo de tipo natural
HCT116 KRASKO (+/)	CDN	Inactivación del alelo KRAS mutante en células parentales heterocigóticas
RKO Parental	CDN	Células parentales triploides que contienen dos alelos BRAF mutantes (V600E) y un alelo de tipo natural
RKO BRAF KO (+/-/-)	CDN	Inactivación de ambos alelos BRAF mutantes (V600E) en células parentales triploides
A375 para padres	Melanoma	Línea parental hipotriploide portadora de la mutación BRAF (V600E)
A375 NRAS (Q61K/+)	Melanoma	Activación heterocigótica de la mutación activadora de NRAS (Q61K)
G-361	Melanoma	BRAF (V600E) mutante
A549	NSCLC	mutante BRAF
H2212	NSCLC	mutante BRAF
H1437	NSCLC	KRAS de tipo natural
H226	NSCLC	KRAS de tipo natural

- 5 Se realizó una ronda inicial de ensayos de agente único en los pares de líneas celulares A375 (figura 20), HCT116 (figura 21) y RKO-isogénico (figura 22). Los valores de  $CI_{50}$  se muestran en la tabla 18. Estos no revelaron diferencias en respuesta a la inhibición de ERK o MEK entre las dos líneas celulares dentro del par isogénico A375 y HCT116. Esto sugiere que bajo las condiciones de ensayo evaluadas 1) el alelo NRAS mutante activado no genera resistencia a la inhibición de MEK o ERK en las células A375 y 2) la sensibilidad de HCT116 a la inhibición de MEK/ERK no está acoplada al alelo KRAS mutante.
- 10

Tabla 18 – Valores de  $CI_{50}$  de agente único

Compuesto	A375		HCT116		RKO	
	Parental	NRAS (Q61K/+)	Parental	KRAS KO (+/-)	Parental	BRAF KO (+/-/-)
BVD-523	0,193	0,243	0,256	0,316	0,621	0,762
SCH772984	0,043	0,079	0,116	0,141	0,126	0,125
Trametinib	0,0003	0,0005	0,007	0,006	0,008	0,003
MEK-162	0,023	0,033	0,114	0,113	0,210	0,023
GDC-0623	0,008	0,010	0,031	0,029	0,032	0,005
GDC-0973	0,002	0,003	0,090	0,061	0,040	0,031
Paclitaxel	0,003	0,006	0,003	0,003	0,003	0,003

Tabla 19 - Volúmenes de Bliss

	A549	H1437	H2122	H226	HCT116 KRAS KO (+/-)	HCT116 Parental	RKO BRAF V600E KO (+/-/-)	RKO Parental	A375 NRAS (Q61K/+)	A375 Parental	G-361
<b>BVD-523 x GDC-0623</b>	nt	0,29	0,633	-0,505	nt	nt	nt	nt	0,014	-0,963	4,07
<b>BVD-523 x MEK-162</b>	nt	nt	nt	nt	-0,221	1,09	-0,781	-0,748	-0,117	-0,488	1,29
<b>BVD-523 x Trametinib</b>	-1,06	-0,324	0,361	0,364	0,811	0,606	-1,88	-2,16	0,188	-1,83	0,774
<b>SCH772984 x GDC-0623</b>	-0,0669	0,525	0,244	-0,792	nt	nt	nt	nt	0,442	-0,444	4,79
<b>SCH772984 x MEK-162</b>	nt	nt	nt	nt	1,25	1,4	2,47	0,378	-0,697	-0,261	1,53
<b>SCH772984 x Trametinib</b>	-0,436	-1,44	-0,0333	-3,15	1,94	2,09	4,03	-1,59	0,0516	-0,256	2,42

Tabla 20 - Volúmenes de Loewe

	A549	H1437	H2122	H226	HCT116 KRAS KO (+/-)	HCT116 Parental	RKO BRAF V600E KO (+/-/-)	RKO Parental	A375 NRAS (Q61K/+)	A375 Parental	G-361
<b>BVD-523 x GDC-0623</b>	nt	0,899	1,1	0,731	nt	nt	nt	nt	-0,0852	-0,217	4,39
<b>BVD-523 x MEK-162</b>	nt	nt	nt	nt	1,3	1,93	3,08	0,596	1,18	0,821	1,94
<b>BVD-523 x Trametinib</b>	1,69	2,35	1,61	2,77	3,1	2,05	2,99	1,43	2,2	0,294	1,65
<b>SCH772984 x GDC-0623</b>	0,846	1,52	1,1	1,22	nt	nt	nt	nt	0,0892	0,256	4,74
<b>SCH772984 x MEK-162</b>	nt	nt	nt	nt	3,27	3,08	2,56	1,96	0,685	1,34	1,95
<b>SCH772984 x Trametinib</b>	2,4	2,4	2	2,1	4,34	4,23	2,52	2,71	2,1	1,95	2,72

Tabla 21 - Puntuaciones de sinergia

	A549	H1437	H2122	H226	HCT116 KRAS KO (+/-)	HCT116 Parental	RKO BRAF V600E KO (+/-/-)	RKO Parental	A375 NRAS (Q61K/+)	A375 Parental	G-361
<b>BVD-523 x GDC-0623</b>	nt	0,562	0,483	0,578	nt	nt	nt	nt	0,465	0,498	2,5
<b>BVD-523 x MEK-162</b>	nt	nt	nt	nt	1,58	2,28	2,53	0,777	1,43	1,49	1,88
<b>BVD-523 x Trametinib</b>	1,59	1,51	0,748	1,35	3,23	2,46	2,82	1,06	1,28	0,731	1,23
<b>SCH772984 x GDC-0623</b>	0,897	0,695	0,546	0,679	nt	nt	nt	nt	0,695	0,673	2,74
<b>SCH772984 x MEK-162</b>	nt	nt	nt	nt	3,2	3,4	2,06	1,26	1,22	1,54	2,08
<b>SCH772984 x Trametinib</b>	2	1,39	0,927	1,23	4,92	4,32	1,97	1,81	1,29	1,19	1,53

Sorprendentemente, la delección de los alelos BRAF (V600E) mutantes en las células RKO aumentó la sensibilidad a varios de los inhibidores de MEK, pero no alteró notablemente la respuesta a la inhibición de ERK (figura 22). Esto es coherente con la observación general de que las modulaciones aguas arriba de la ruta de MAPK que alteran la sensibilidad a los inhibidores de MEK no afectan notablemente la sensibilidad a la inhibición de ERK.

- 5 Las interacciones de combinación entre dos compuestos se evaluaron a través de una matriz de concentraciones usando los modelos de independencia de Bliss y aditividad de Loewe con software de bioinformática Chalice™ (Horizon Discovery Group, Cambridge, MA). Cáliz™ permite identificar posibles interacciones sinérgicas al mostrar el exceso de inhibición calculado sobre el previsto como aditivo en la matriz de dosis como un mapa de calor, y al informar una "puntuación de sinergia" cuantitativa basada en el modelo de Loewe.
- 10 La visualización de los mapas de calor de "exceso de inhibición" de Bliss para las líneas celulares A375 parental y NRAS mutante (Q61K) reveló una pequeña ventana de sinergia entre BVD-523 y los tres inhibidores de MEK probados (figura 23, figura 25, figura 27). Estas observaciones se confirmaron en una segunda línea celular mutante BRAF G-361 (figura 37, figura 39, figura 41) y usando un segundo inhibidor de ERK de referencia SCH772984 (figura 24, figura 26, figura 28 y figuras 38, 40, 42, respectivamente). Aunque no tan fuertes, estas ventanas de
- 15 sinergia también se detectaron principalmente cuando los datos se analizaron usando el modelo de Loewe.

En resumen, estos resultados sugieren que las interacciones entre BVD-523 y los inhibidores de MEK pueden ser potencialmente sinérgicas en líneas celulares de melanoma mutadas para BRAF.

- 20 Por el contrario, cuando se evaluó usando el modelo Bliss, las interacciones entre BVD-523 o SCH772984 y los inhibidores de MEK en HCT116 (figura 29 - figura 32) y las líneas pulmonares (figura 44 - figura 57) parecían ser principalmente aditivas. En las células RKO (figura 33 - figura 36) hubo focos de antagonismo leve a concentraciones más altas. Las puntuaciones en exceso fueron generalmente más positivas, pero aun así principalmente aditivas, cuando las combinaciones de BVD-523 se analizaron usando el modelo de Loewe. También se obtuvieron resultados similares para las combinaciones SCH772984 en estas líneas celulares usando el modelo de Bliss, sin embargo, el modelo de Loewe sugirió la posible presencia de regiones de sinergia en HCT116 y
- 25 algunas de las líneas pulmonares que no eran evidentes en el modelo de Bliss.

- Las interacciones sinérgicas se puntuaron de dos maneras. El exceso de actividad sobre el previsto si una combinación fuera aditiva puede calcularse usando una puntuación de volumen simple, que calcula el volumen entre la superficie de respuesta medida y la prevista. Esta puntuación de volumen muestra si la respuesta general a una combinación es sinérgica (valores positivos), antagónica (valores negativos) o aditiva (valores ~ 0). La tabla 19 muestra los volúmenes de Bliss y la tabla 20 muestra los volúmenes de Loewe; nt = no sometido a prueba. Además, se calcula una "puntuación de sinergia", un volumen ponderado de inhibición controlado positivamente sobre la aditividad de Loewe, y los resultados se muestran en la tabla 21; nt = no sometido a prueba. Esto proporciona una priorización adicional que favorece las combinaciones cuya sinergia se produce a niveles de efecto altos, ignorando las porciones antagónicas de la superficie de respuesta.
- 30

### 35 Ejemplo 8

Interacciones de combinación entre los inhibidores de ERK

- Se cultivaron células A375 de la línea celular de melanoma mutante RAF en DMEM con FBS al 10 % y se sembraron en placas de 96 pocillos por triplicado a una densidad inicial de 2000 células por pocillo. Las interacciones de combinación entre los inhibidores de ERK BVD-523 y SCH772984 se analizaron después de 72 horas tal como se describió anteriormente en el ejemplo 7. La viabilidad se determinó usando reactivo CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante y la luminiscencia se detectó usando el lector de placas BMG FLUOstar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).
- 40

- La visualización de los mapas de calor de "exceso de inhibición" de Loewe y Bliss sugirió que la combinación de BVD-523 y SCH772984 era principalmente aditiva con ventanas de sinergia potencial en dosis de intervalo medio (figura 58).
- 45

En resumen, estos resultados sugieren que las interacciones entre BVD-523 y SCH772984 son al menos aditivas y, en algunos casos, sinérgicas.

### Documentos

- 50 ABSALAN, Farnaz; Mostafa Ronaghi (2008). Molecular Inversion Probe Assay. Methods in Molecular Biology 396. Humana Press. págs. 315-330.

GREGGER, James G., *et al.* "Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations." Molecular cancer therapeutics 11.4 (2012): 909-920.

HARDENBOL, P. *et al.* Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. Nat. Biotechnol.

2003, n.º 21, págs. 673-678.

HATZIVASSILIOU, G. *et al.*, "RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth." *Nature* 464.7287 (2010): 431-435.

5 KING, Alastair J., *et al.* "Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions." *PloS one* 8.7 (2013): e67583.

LITTLE, A.S. *et al.*, Amplification of the Driving Oncogene, KRAS or BRAF, Underpins Acquired Resistance to MEK1/2 Inhibitors in Colorectal Cancer Cells. *Sci. Signal.* 4, ra17 (2011).

MANANDHAR SP, Hildebrandt ER, Schmidt WK. Small-molecule inhibitors of the Rce1p CaaX protease. *J Biomol Screen.* 2007;12(7):983-993.

10 MAURER, T, Garrenton, LS, Oh, A, Pitts, K, Anderson, DJ, Skelton, NJ, Fauber, BP, Pan, B, Malek, S, Stokoe, D, Ludlam, MJC, Bowman, KK, Wu, J, Giannetti, AM, Starovasnik, MA, Mellman, I, Jackson, PK, Rudolph, J, Wang, W, Fang, G. Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *PNAS.* 2012;109(14):5299-304.

METZKER, Emerging technologies in DNA sequencing *Genome Res.* 2005. 15: 1767-1776

15 MITTAL, Rohit *et al.* "The acetyltransferase activity of the bacterial toxin YopJ of *Yersinia* is activated by eukaryotic host cell inositol hexakisphosphate." *Journal of Biological Chemistry* 285.26 (2010): 19927-19934.

NILSSON, M. *et al.*, Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science.* 1994, n.º265, págs. 2085-2088.

20 OTA *et al.*, Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2857-64.

PATGIRI, A, Yadav, KK, Arora, PS, Bar-Sagi, D. An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction. *Nat Chem Biol.* 2011;7:585-587.

PORTER SB, Hildebrandt ER, Breevoort SR, Mokry DZ, Dore TM, Schmidt WK. Inhibition of the CaaX proteases Rce1p and Ste24p by peptidyl (acyloxy)methyl ketones. *Biochim Biophys Acta.*2007;1773(6):853-862.

25 SHIMA, F, Yoshikawa, Y, Ye, M, Araki, M, Matsumoto, S, Liao, J, Hu, L, Sugimoto, T, Ijiri, Y, Takeda, A, Nishiyama, Y, Sato, C, Muraoka, S, Tamura, A, Osoda, T, Tsuda, K-I, Miyakawa, T, Fukunishi, H, Shimada, J, Kumasaka, Yamamoto, M, Kataoka, T. In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *PNAS.* 2013;110(20):8182-7.

## REIVINDICACIONES

1. Un primer agente anticancerígeno (i), que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y segundo agente anticancerígeno (ii), para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, en el que el segundo agente anticancerígeno es
  - 5 (ii-1) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o
  - (ii-2) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Un método *in vitro* para efectuar la muerte de células cancerosas que comprende poner en contacto la célula cancerosa con una cantidad eficaz del primer y segundo agente anticancerígeno según la reivindicación 1.
 

10
3. Un kit para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto que comprende una cantidad eficaz del primer y segundo agente anticancerígeno según la reivindicación 1, envasados junto con instrucciones para su uso.
4. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, comprendiendo la composición farmacéutica un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz del primer y segundo agente anticancerígeno según la reivindicación 1, en la que la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo.
 

15
5. El primer y segundo agente anticancerígeno para el uso según la reivindicación 1, el método *in vitro* según la reivindicación 2, el kit para el uso según la reivindicación 3, o la composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 4, en los que
  - (i) el sujeto es un mamífero, o en los que la célula cancerosa se ha obtenido de un sujeto, que es un mamífero; y en los que el mamífero puede seleccionarse del grupo que consiste en seres humanos, primates, animales de granja y animales domésticos; y/o
 

20
  - 25 (ii) el sujeto con cáncer, o el sujeto del cual se ha obtenido la célula cancerosa, tiene una mutación somática de RAS o BRAF.
6. El primer y segundo agente anticancerígeno para el uso según las reivindicaciones 1 o 5, método *in vitro* según las reivindicaciones 2 o 5, kit para el uso según las reivindicaciones 3 o 5, o la composición farmacéutica para el uso según las reivindicaciones 4 o 5, en los que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de piel tal como melanoma, cáncer de intestino grueso, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, neuroblastoma, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer testicular y cáncer de tiroides.
 

30
7. El primer y segundo agente anticancerígeno para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5-6, método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 5-6, el kit para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 5-6, o composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en los que al menos un agente terapéutico adicional va a administrarse al sujeto o a la célula cancerosa, o en los que el kit o la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional; en los que el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento del mismo, un agente citotóxico, un fármaco, una toxina, un radionúclido, un inmunomodulador, un agente terapéutico fotoactivo, un agente radiosensibilizador, una hormona, un agente antiangiogénesis, y combinaciones de los mismos; en los que el agente terapéutico adicional puede ser un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, tal como un inhibidor de la ruta PI3K/Akt que se selecciona del grupo que consiste en A-674563 (n.º de CAS 552325-73-2), AGL 2263, AMG-319 (Amgen, Thousand Oaks, CA), AS-041164 (5-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetileno-tiazolidina-2,4-diona), AS-604850 (5-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona), AS-605240 (5-quinoxilina-6-metileno-1,3-tiazolidina-2,4-diona), AT7867 (n.º de CAS 857531-00-1), serie de bencimidazol, Genentech (Roche Holdings Inc., South San Francisco, CA), BML-257 (n.º de CAS 32387-96-5), CAL-120 (Gilead Sciences, Foster City, CA), CAL-129 (Gilead Sciences), CAL-130 (Gilead Sciences), CAL-253 (Gilead Sciences), CAL-263 (Gilead Sciences), n.º de CAS 612847-09-3, n.º de CAS 681281-88-9, n.º de CAS 75747-14-7, n.º de CAS 925681-41-0, n.º de CAS 98510-80-6, CCT128930 (n.º de CAS 885499-61-6), CH5132799 (n.º de CAS 1007207-67-1), CHR-4432 (Chroma Therapeutics, Ltd., Abingdon, RU), FPA 124 (n.º de CAS 902779-59-3), GS-1101 (CAL-101) (Gilead Sciences), GSK 690693 (n.º de CAS 937174-76-0), H-89 (n.º de CAS 127243-85-0), Honokiol, IC87114 (Gilead Science), IPI-145 (Intellikine Inc.), KAR-4139 (Karus Therapeutics, Chilworth, RU), KAR-4141 (Karus Therapeutics), KIN-1 (Karus Therapeutics), KT 5720 (n.º de CAS 108068-98-0), miltefosina, diclorhidrato de MK-2206 (n.º de CAS 1032350-13-2), ML-9 (n.º de CAS 105637-50-1), clorhidrato de naltrindol, OXY-111A (NormOxys Inc., Brighton, MA), perifosina, PHT-427 (n.º de CAS 1191951-57-1), inhibidor de PI3 cinasa delta, Merck KGaA (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ), inhibidores de PI3 cinasa
 

35

40

45

50

55

- delta, Genentech (Roche Holdings Inc.), inhibidores de PI3 cinasa delta, Incozen (Incozen Therapeutics, Pvt. Ltd., Hyderabad, India), inhibidores-2 de PI3 cinasa delta, Incozen (Incozen Therapeutics), inhibidor de PI3 cinasa, Roche-4 (Roche Holdings Inc.), inhibidores de PI3 cinasa, Roche (Roche Holdings Inc.), inhibidores de PI3 cinasa, Roche-5 (Roche Holdings Inc.), inhibidores de PI3-alfa/delta, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd., South San Francisco, CA), inhibidores de PI3-delta, Cellzome (Cellzome AG, Heidelberg, Alemania), inhibidores de PI3-delta, Intellikine (Intellikine Inc., La Jolla, CA), inhibidores de PI3-delta, Pathway Therapeutics-1 (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidores de PI3-delta, Pathway Therapeutics-2 (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidores de PI3-delta/gamma, Cellzome (Cellzome AG), inhibidores de PI3-delta/gamma, Cellzome (Cellzome AG), inhibidores de PI3-delta/gamma, Intellikine (Intellikine Inc.), inhibidores de PI3-delta/gamma, Intellikine (Intellikine Inc.), inhibidores de PI3-delta/gamma, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidores de PI3-delta/gamma, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidor de PI3-gamma Evotec (Evotec), inhibidor de PI3-gamma, Cellzome (Cellzome AG), inhibidores de PI3-gamma, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), inhibidores de PI3K delta/gamma, Intellikine-1 (Intellikine Inc.), inhibidores de PI3K delta/gamma, Intellikine-1 (Intellikine Inc.), pictilisib (Roche Holdings Inc.), PIK-90 (n.º de CAS 677338-12-4), SC-103980 (Pfizer, Nueva York, NY), SF-1126 (Semafore Pharmaceuticals, Indianápolis, IN), SH-5, SH-6, tetrahidrocurcumina, TG100-115 (Targegen Inc., San Diego, CA), triciribina, X-339 (Xcovery, West Palm Beach, FL), XL-499 (Evotech, Hamburg, Alemania), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.
- 5 8. El primer y segundo agente anticancerígeno para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5-7, el método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 5-7, o el kit para el uso según una cualquiera de reivindicaciones 3 y 5-7, en los que la administración del primer y segundo agente anticancerígeno proporciona un efecto sinérgico en comparación con la administración de cualquier agente anticancerígeno solo,
- 10 o en los que poner en contacto la célula cancerosa con los agentes anticancerígenos primero y segundo proporciona un efecto sinérgico en comparación con poner en contacto la célula cancerosa con cualquier agente anticancerígeno solo.
- 15 9. El primer y segundo agente anticancerígeno para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5-8, el método *in vitro* según uno cualquiera de las reivindicaciones 2 y 5-8, o el kit para el uso según cualquiera de reivindicaciones 3 y 5-8, en los que el segundo agente anticancerígeno es trametinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 20 y en los que BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o trametinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo van a administrarse en forma de una composición farmacéutica que comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 25 10. La composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en la que
- 30 (i) la composición farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria que comprende ambos agentes anticancerígenos; o
- (ii) el primer agente anticancerígeno está en una primera forma de dosificación unitaria y el segundo agente anticancerígeno está en una segunda forma de dosificación unitaria, separada de la primera.
- 35 11. La composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en la que
- 40 (i) los agentes anticancerígenos primero y segundo deben administrarse conjuntamente al sujeto; o
- (ii) en la que los agentes anticancerígenos primero y segundo van a administrarse al sujeto en serie; en la que el primer agente anticancerígeno puede administrarse al sujeto antes que el segundo agente anticancerígeno; o en la que el segundo agente anticancerígeno puede administrarse al sujeto antes que el primer agente anticancerígeno.
- 45 12. Una composición para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, en la que la composición comprende BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en combinación con
- 50 (i) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco), MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o
- (ii) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
13. Una composición para su uso en el tratamiento o la mejora de los efectos de un cáncer en un sujeto, en la que la composición comprende
- (i) un inhibidor de MEK de tipo 2 seleccionado del grupo que consiste en trametinib (Japan Tobacco),

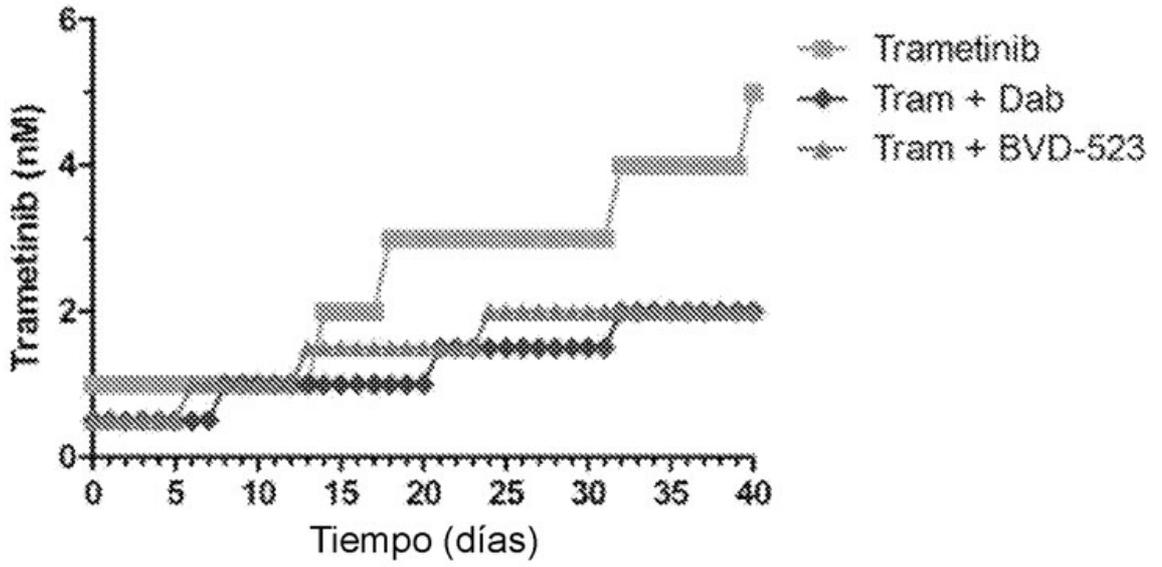
## ES 2 953 311 T3

MEK162, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos; o  
(ii) GDC-0623 (Hoffmann-La Roche) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
para su uso en combinación con BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

FIG. 1

A

Tratamientos con trametinib



B

Tratamientos con dabrafenib

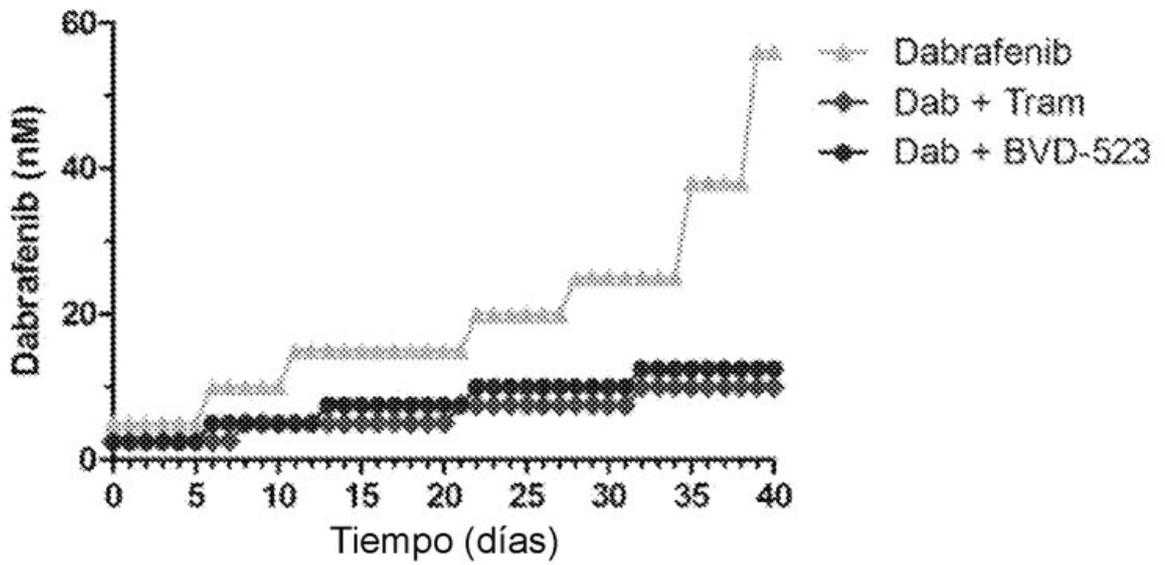


FIG. 1, Cont.

C

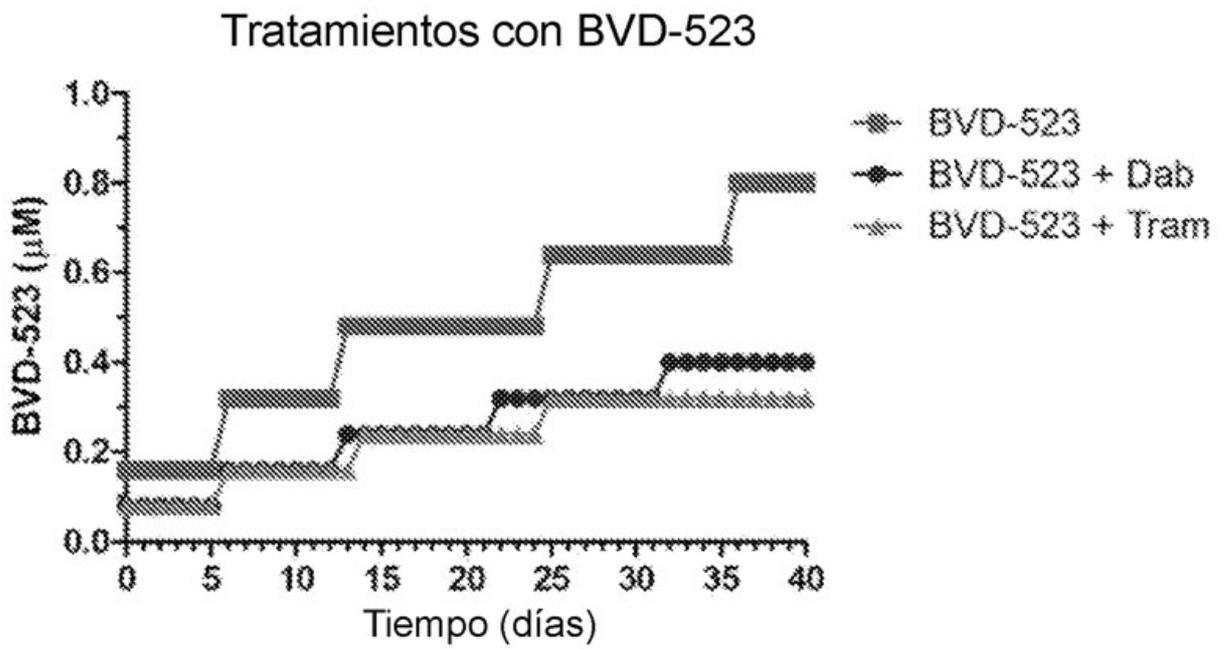


FIG. 2

A

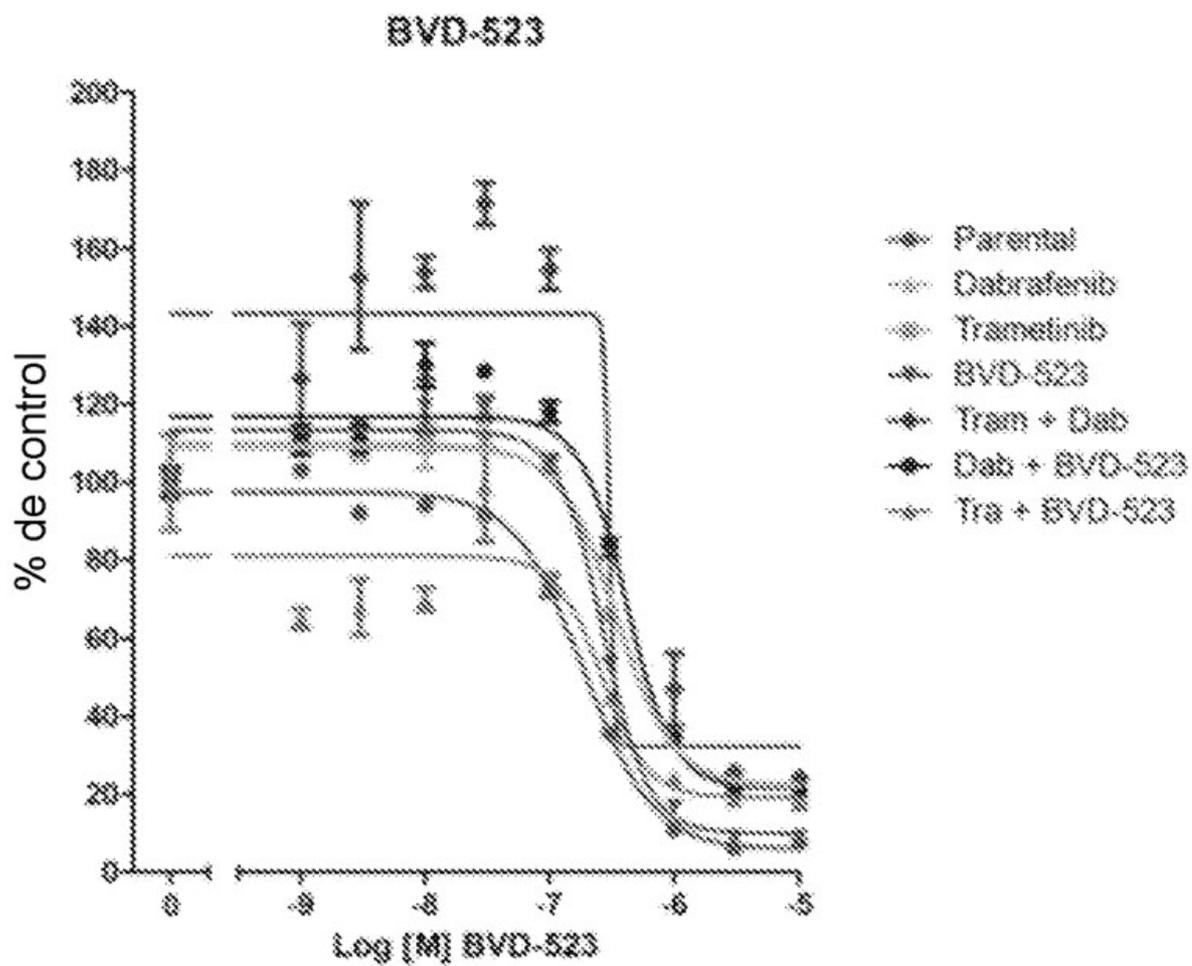
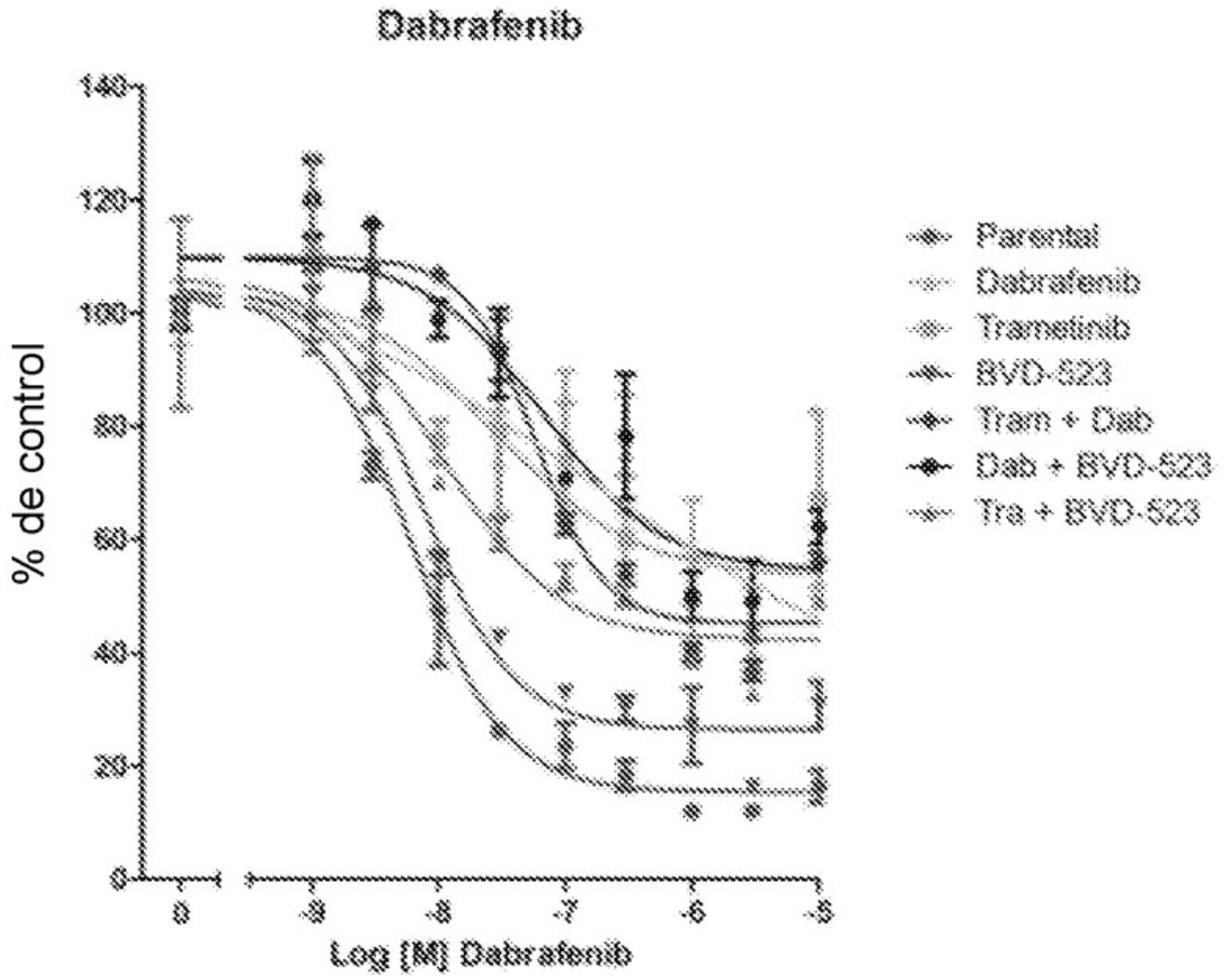


FIG. 2, Cont.

B



# FIG. 2, Cont.

## C

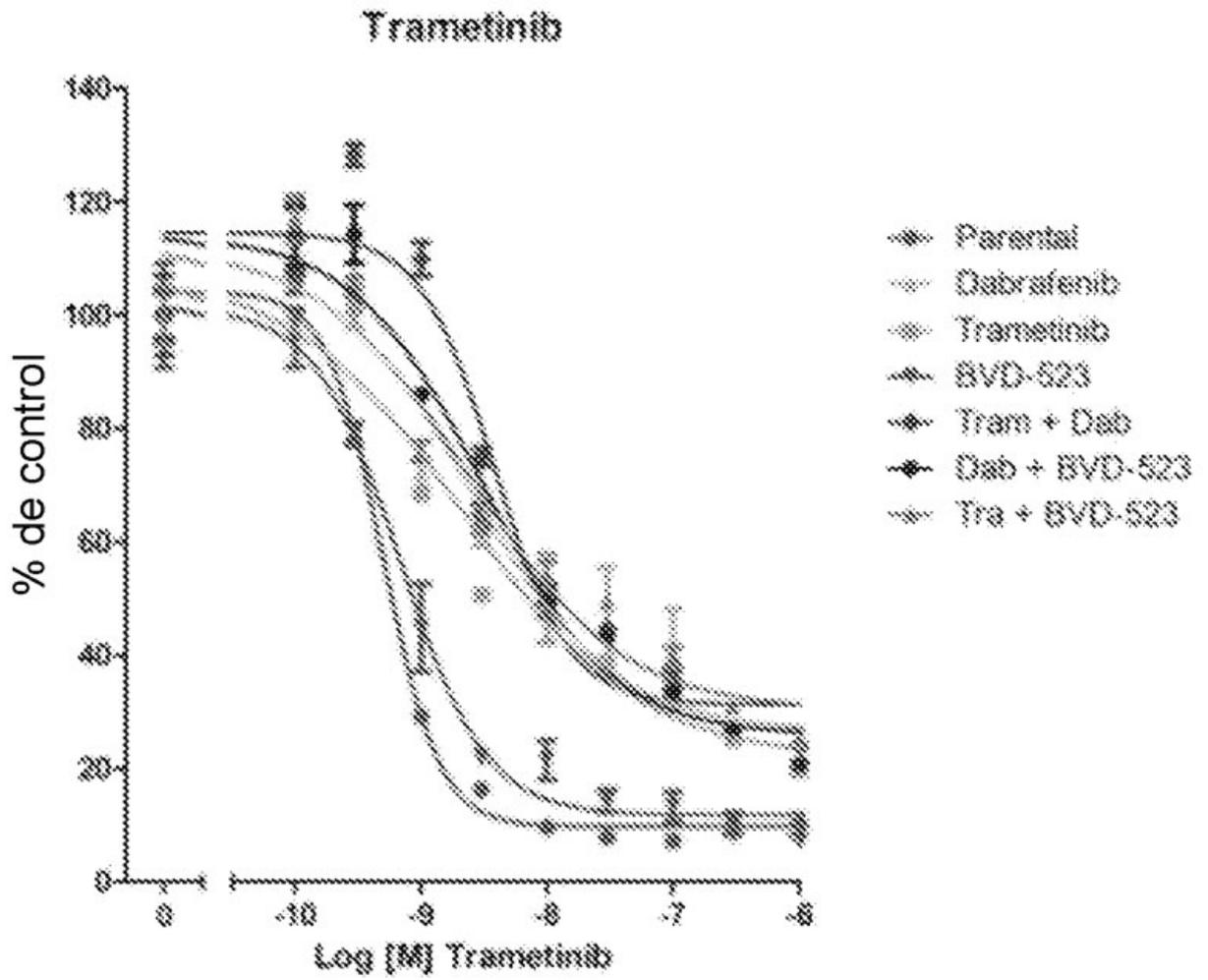


FIG. 2, Cont.

D

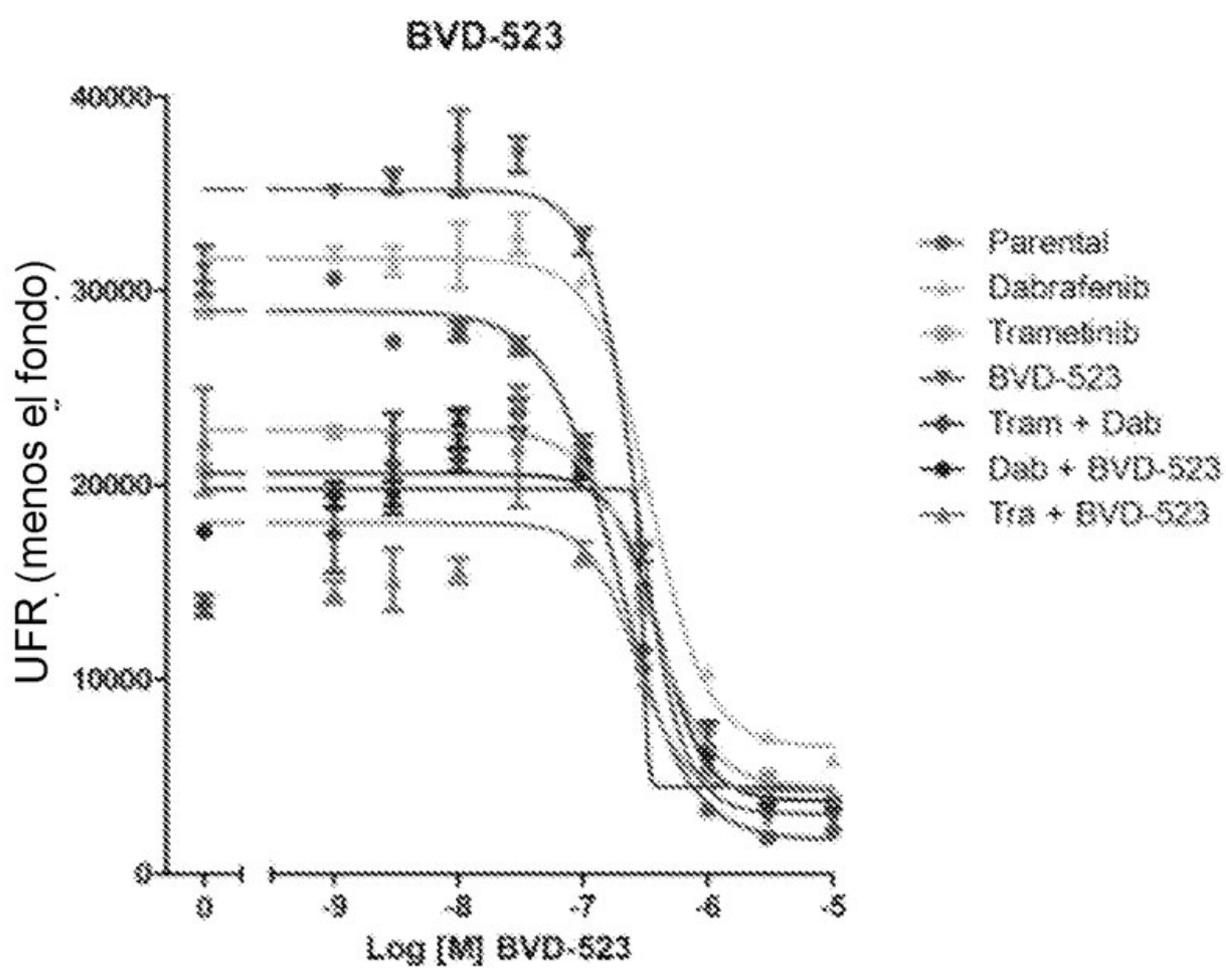


FIG. 2, Cont.

Π

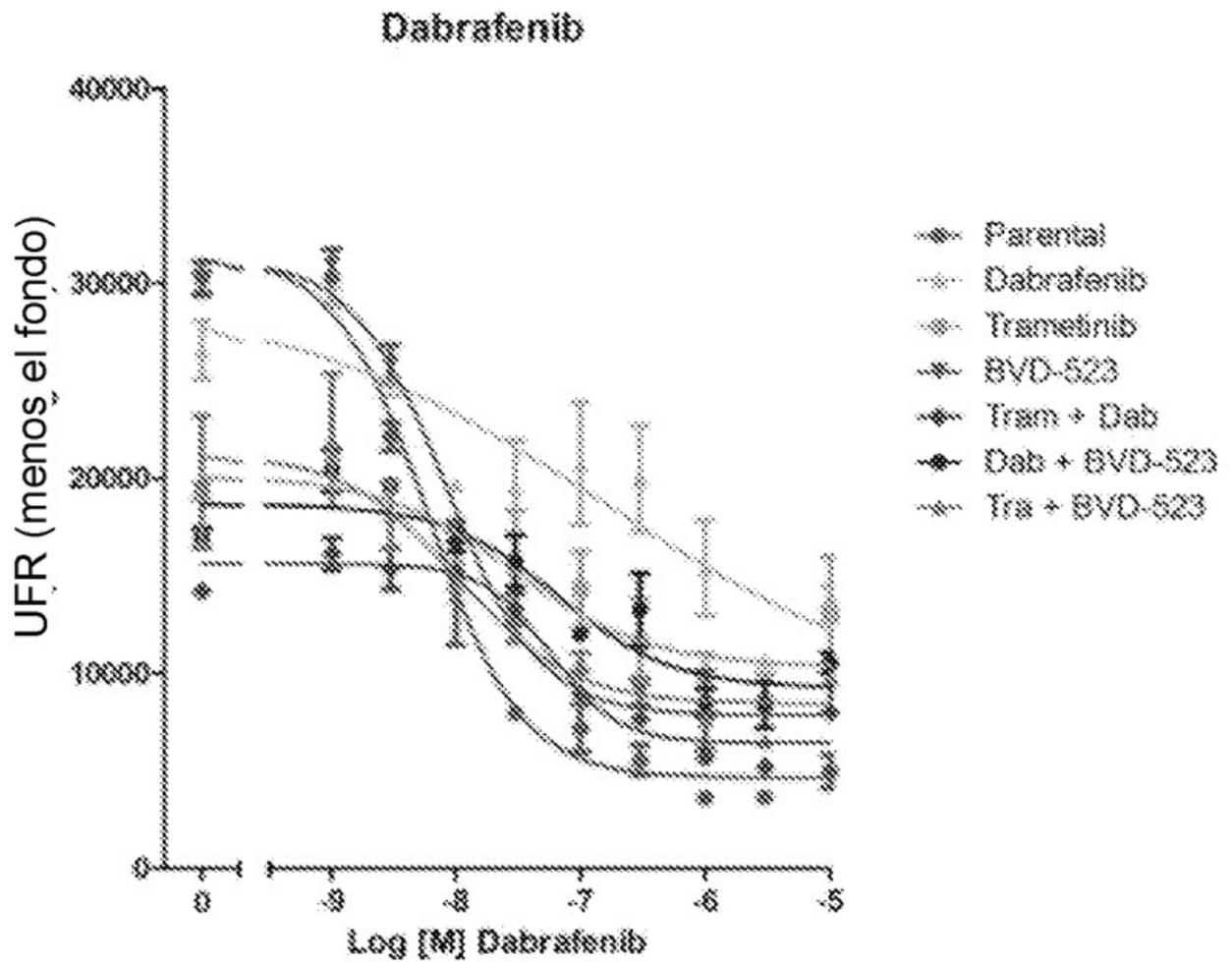
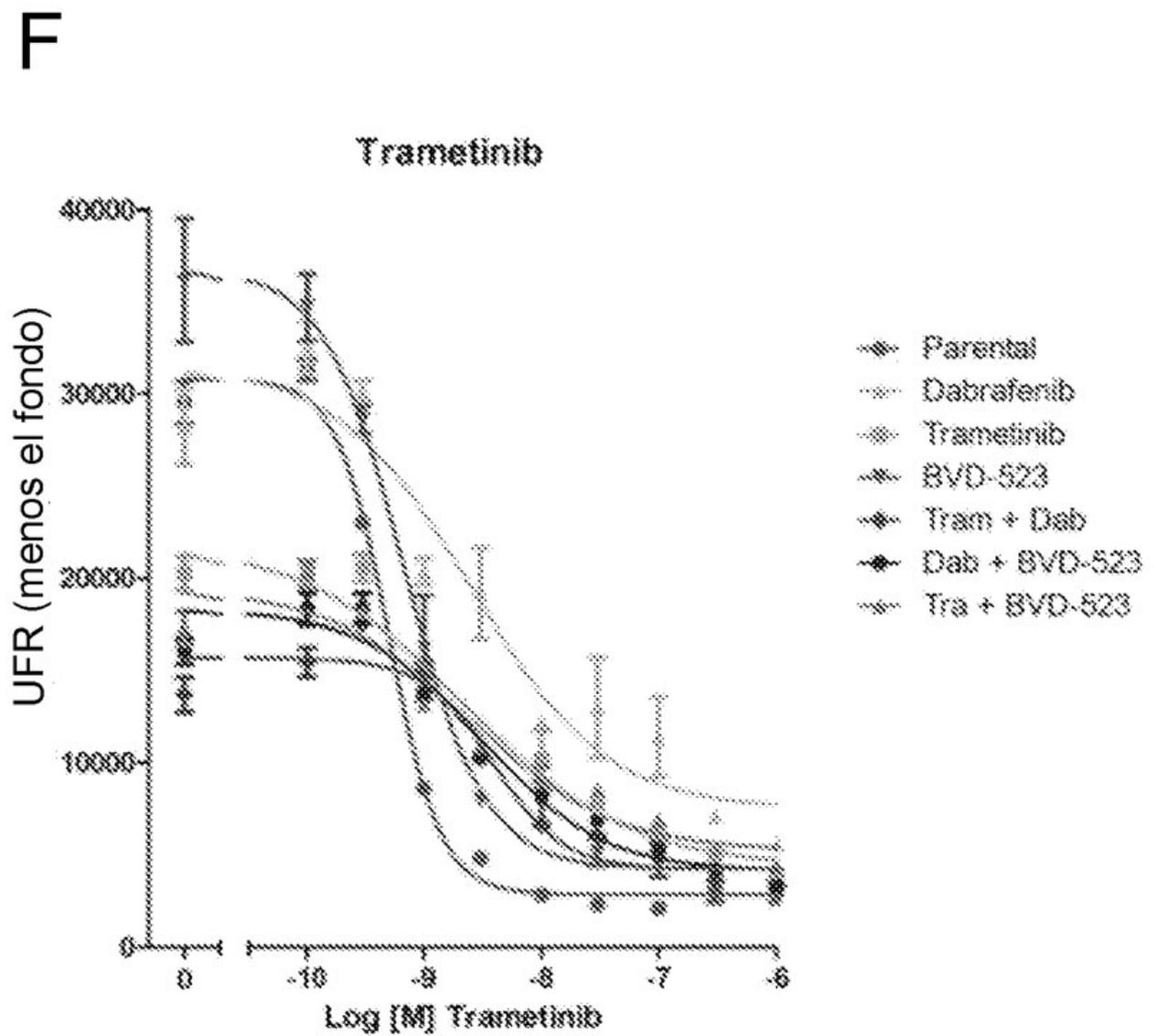


FIG. 2, Cont.



# FIG. 2, Cont.

## G

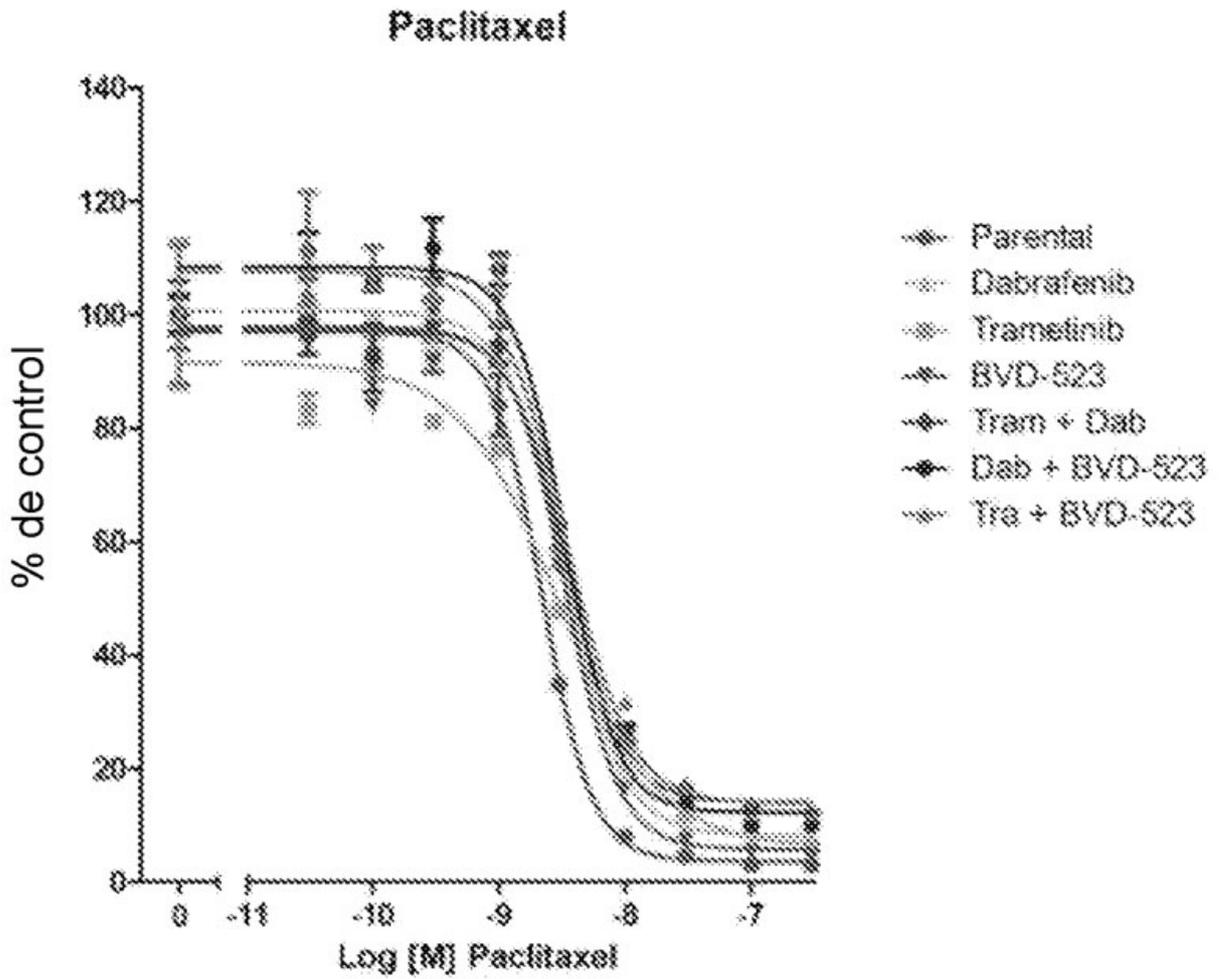


FIG. 2, Cont.

H

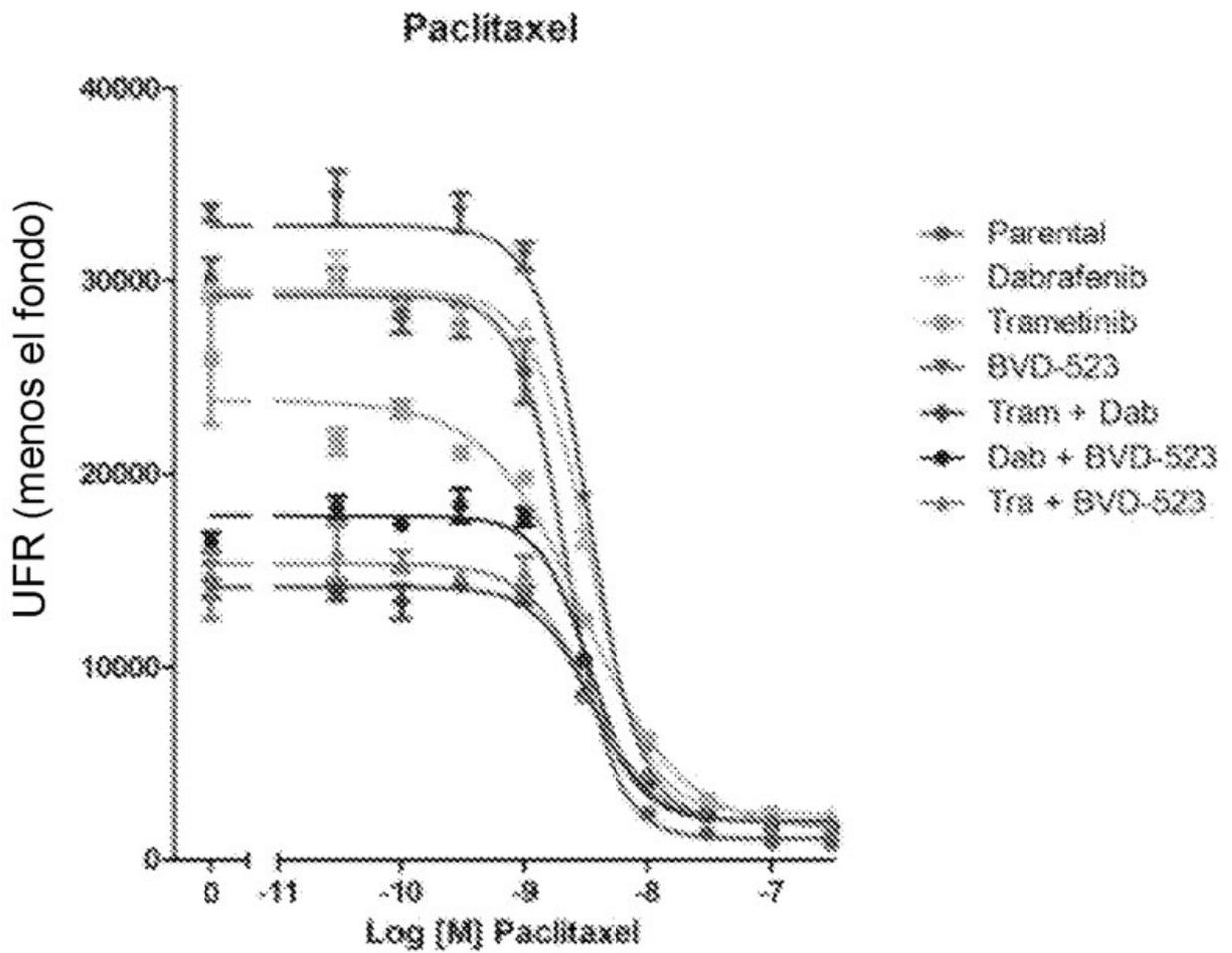
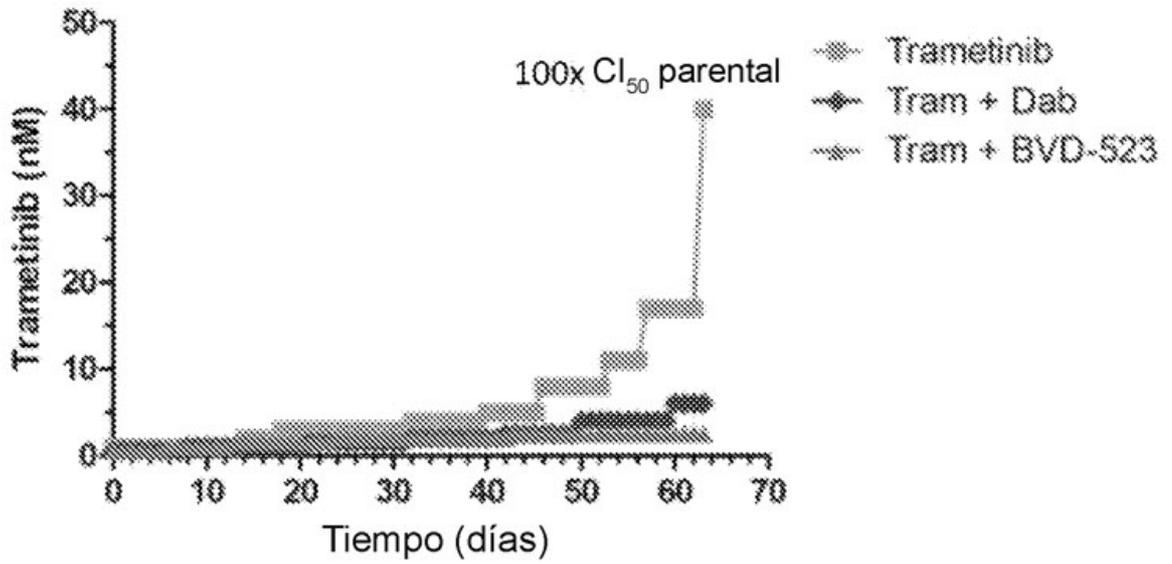


FIG. 3

A

Tratamientos con trametinib



B

Tratamientos con dabrafenib

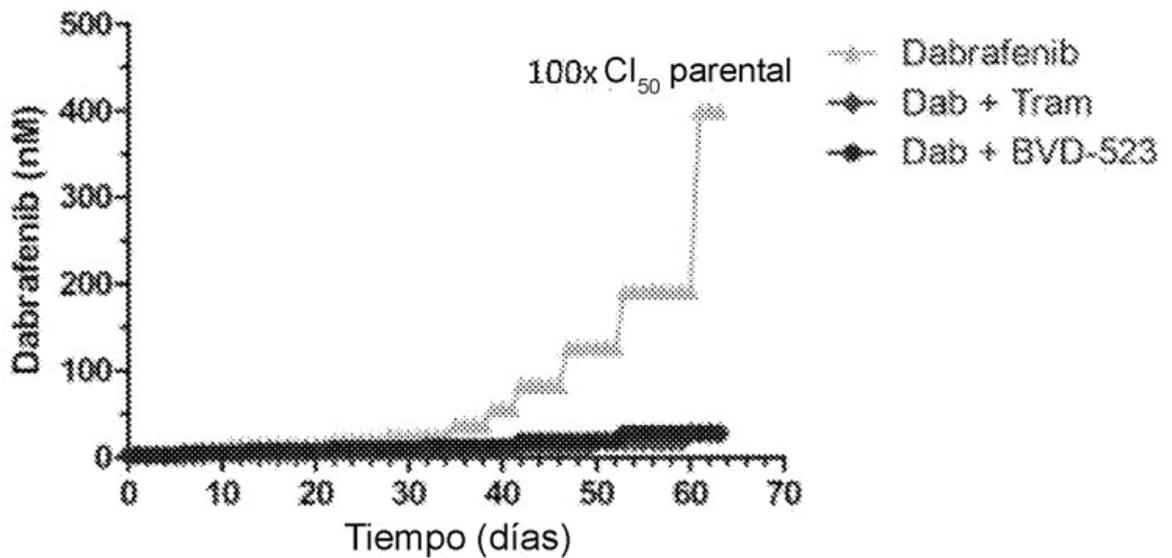
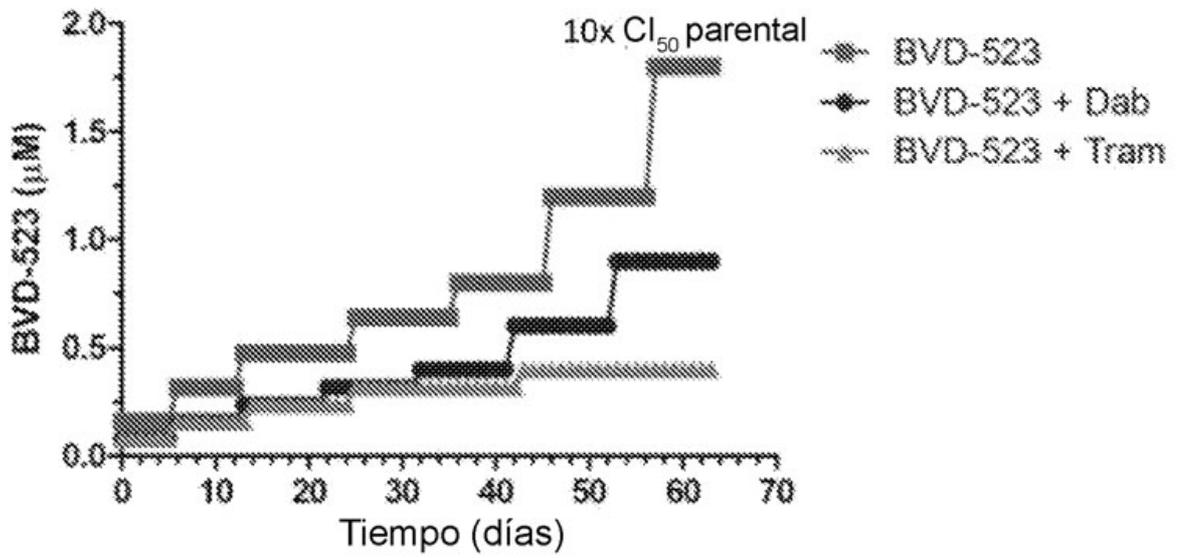


FIG. 3, Cont.

C

Tratamientos con BVD-523



D

Comparación de un solo agente

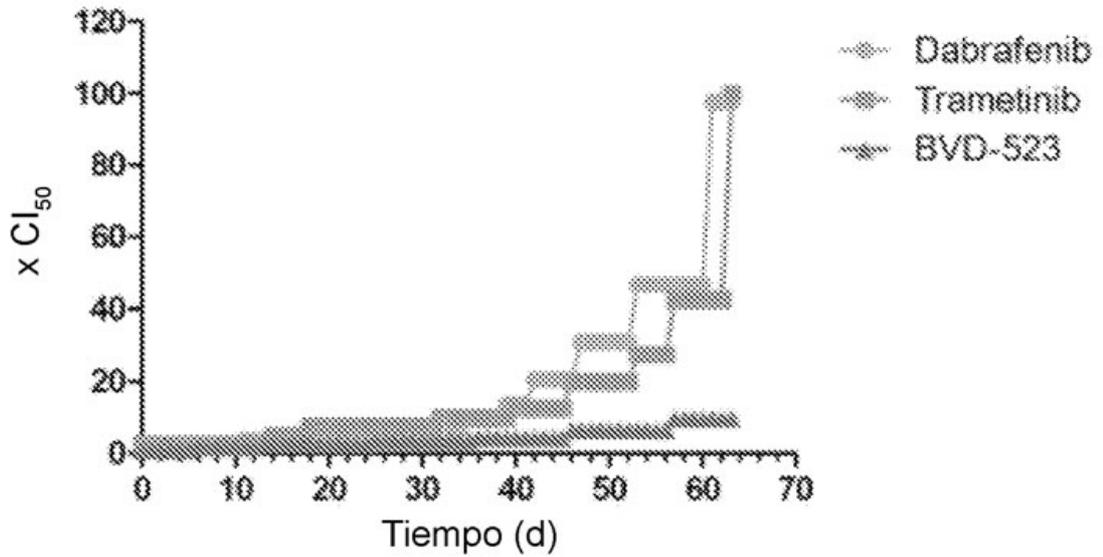


FIG. 4

A

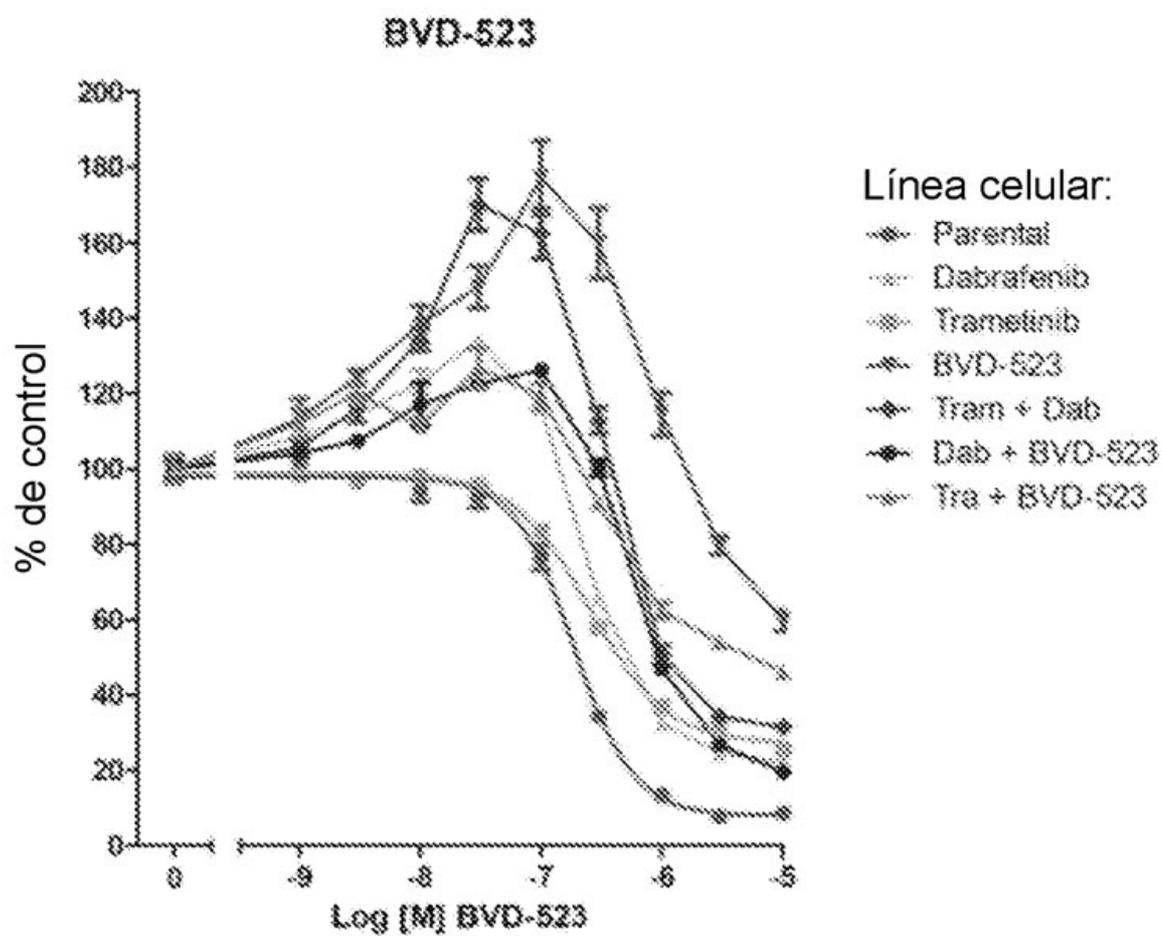


FIG. 4, Cont.

B

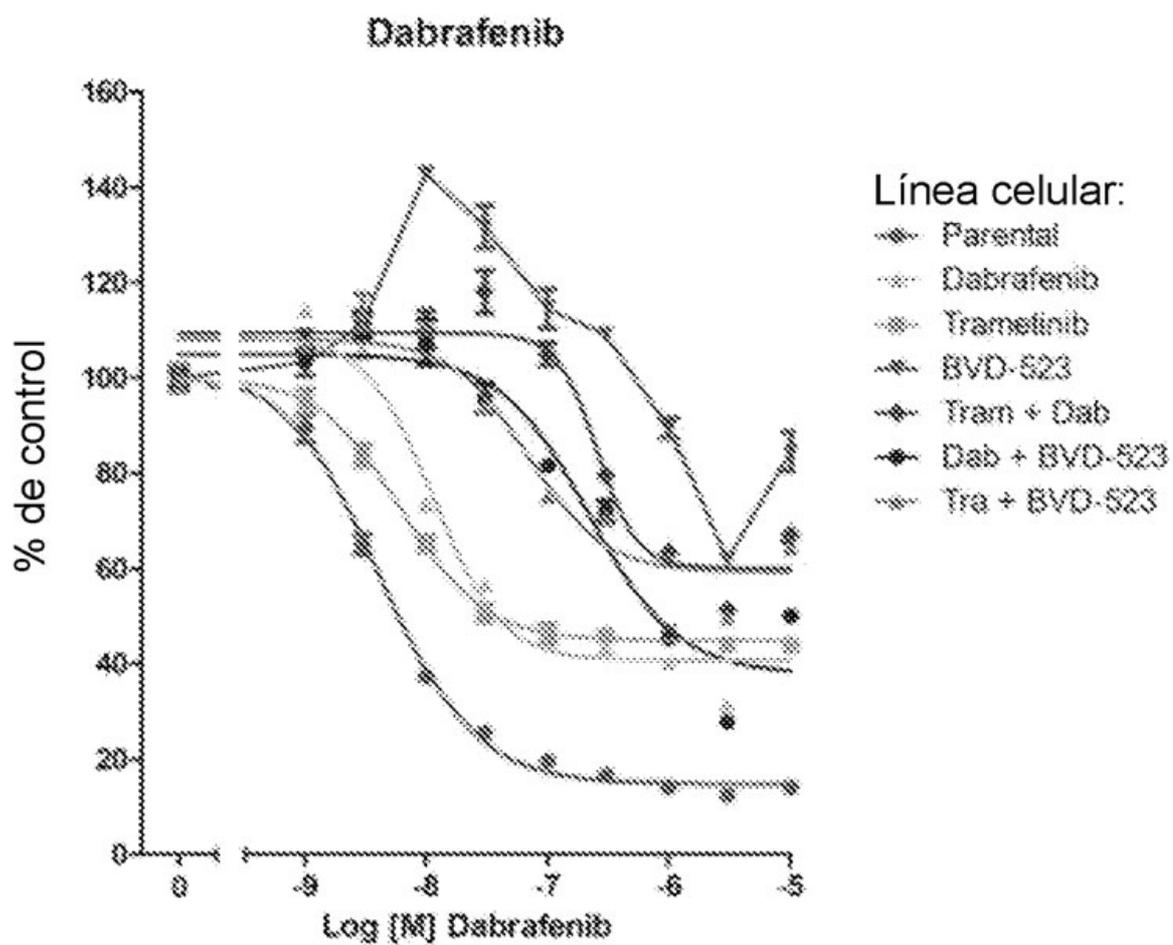


FIG. 4, Cont.

C

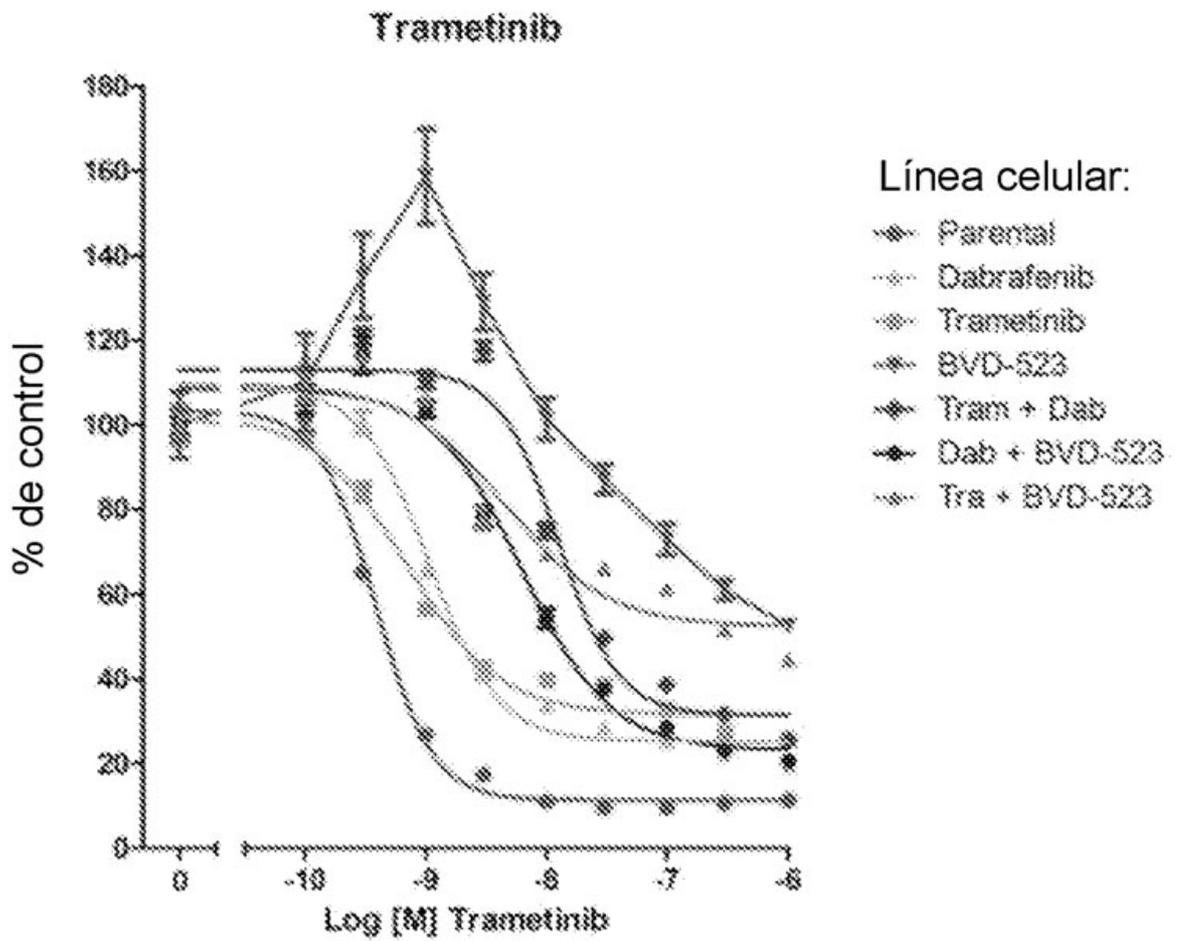


FIG. 4, Cont.

D

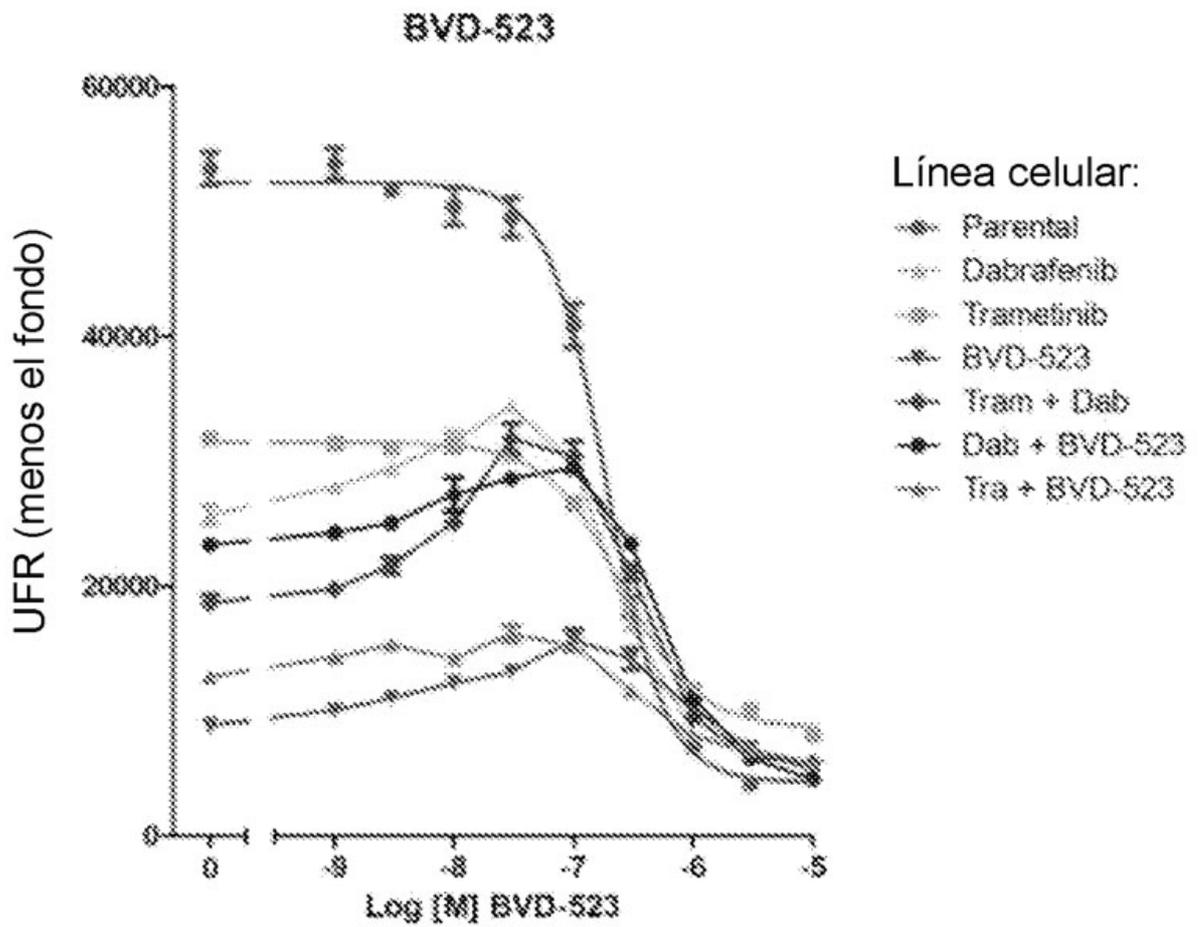


FIG. 4, Cont.

E

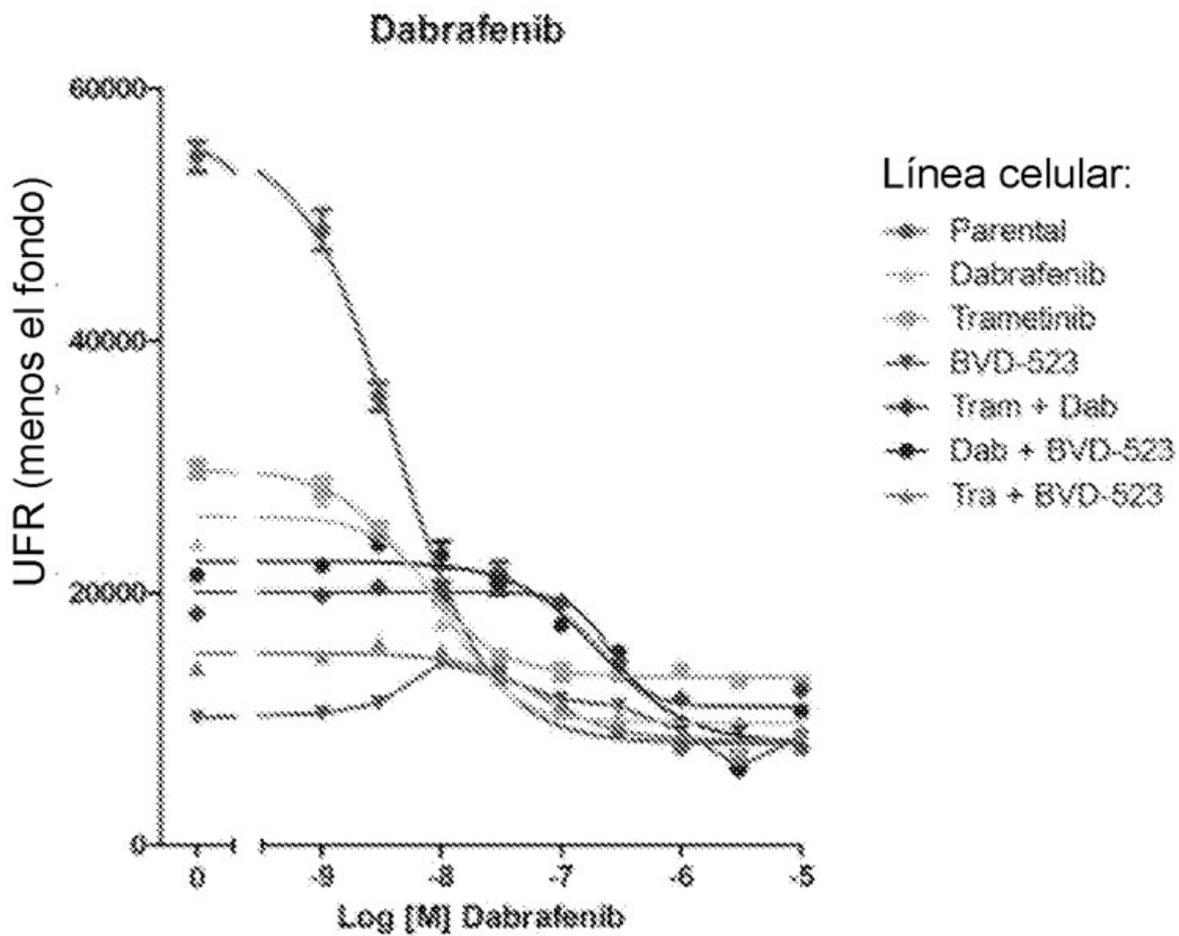


FIG. 4, Cont.

F

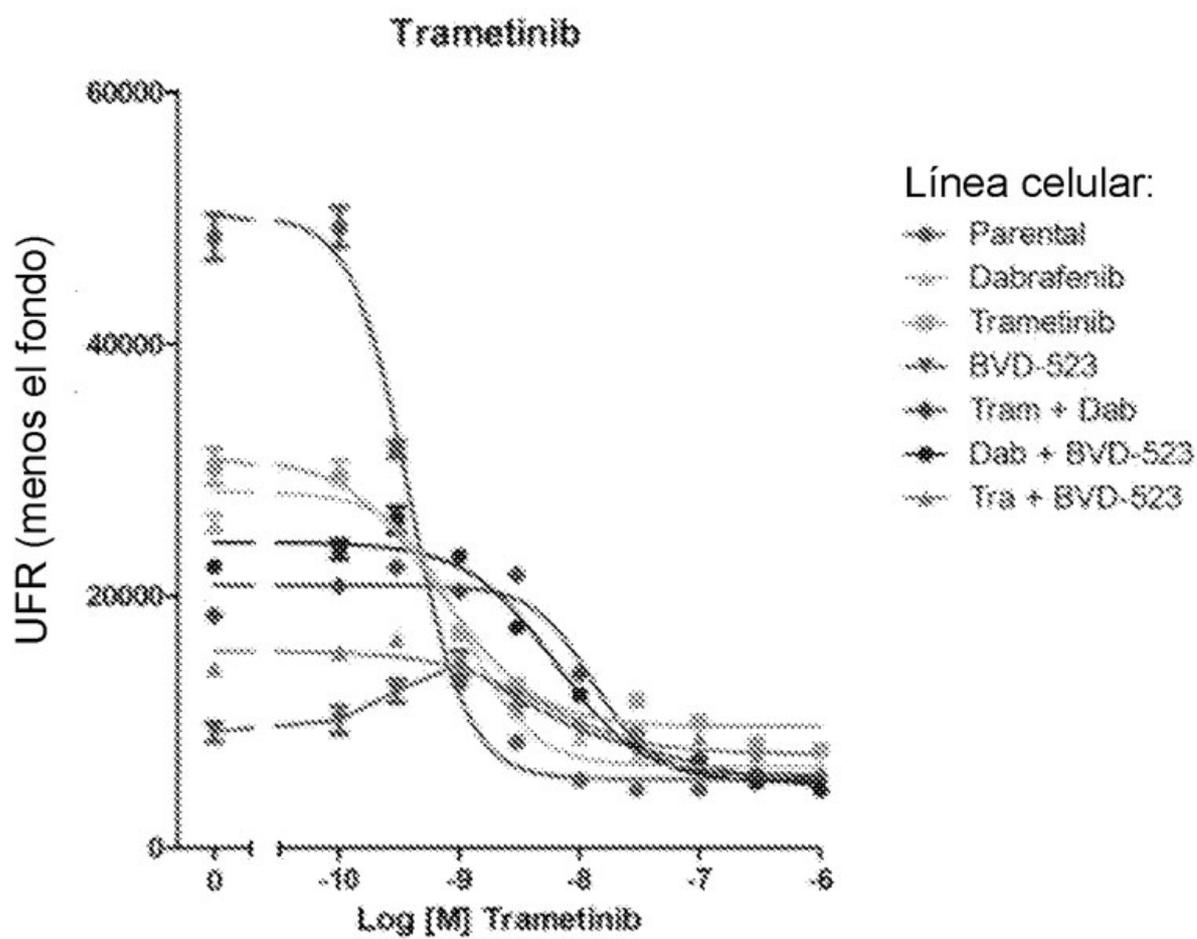


FIG. 4, Cont.

G

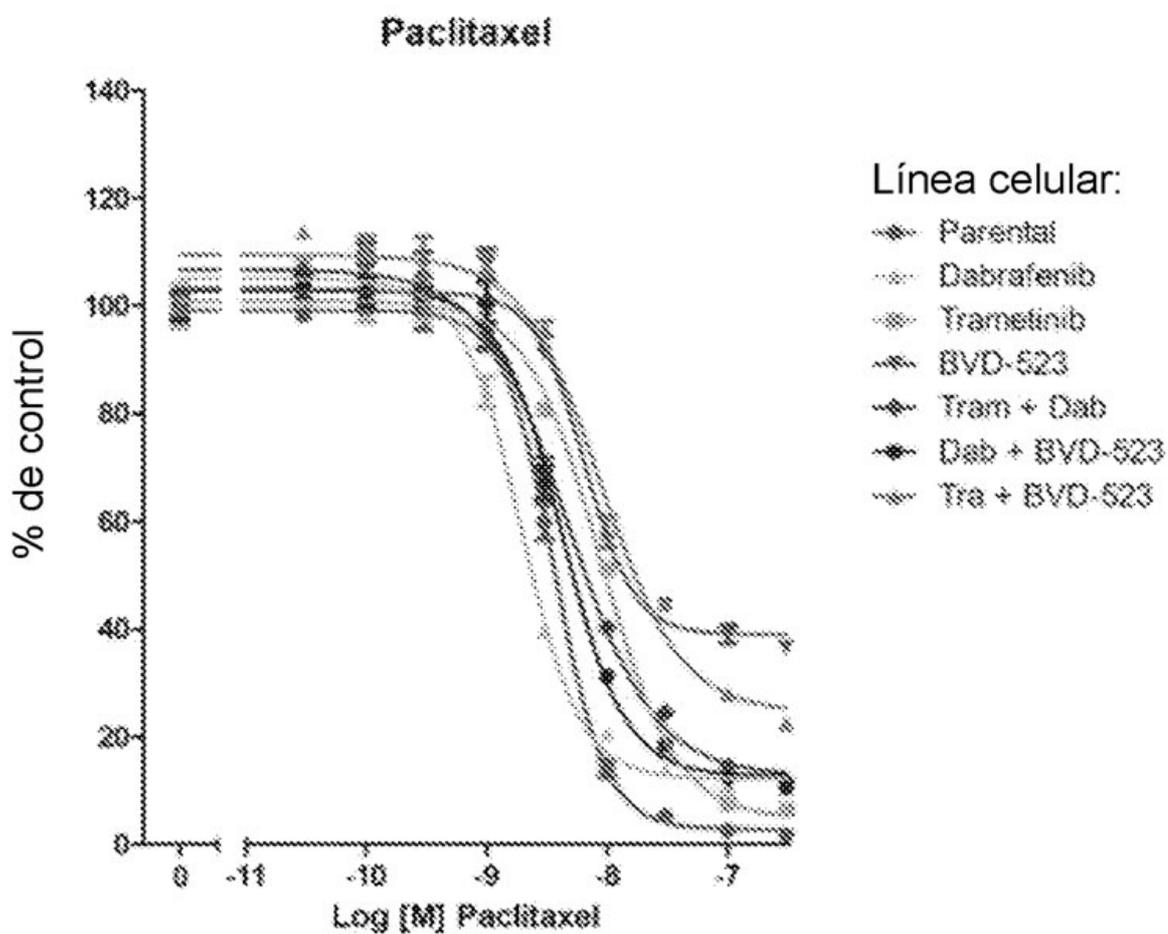


FIG. 4, Cont.

H

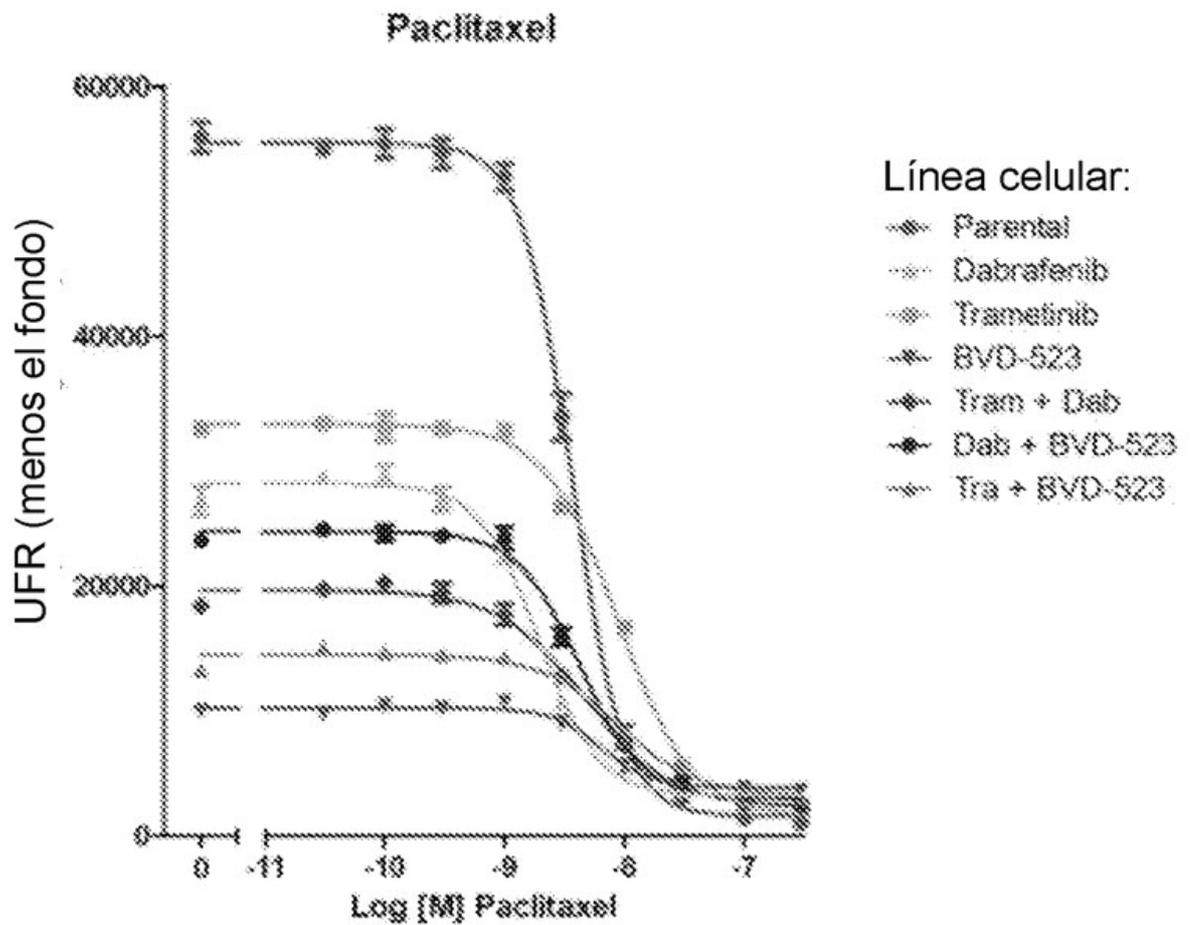


FIG. 5

A

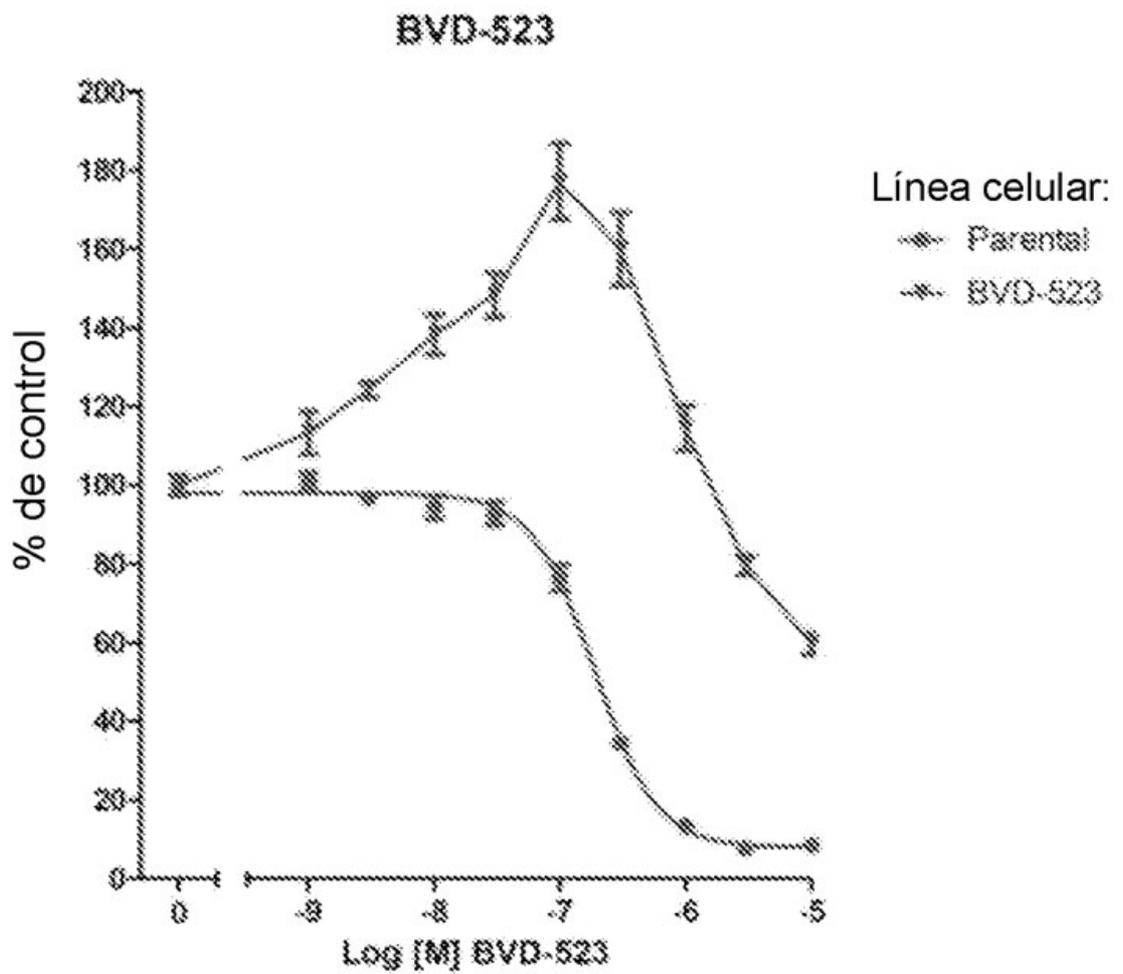


FIG. 5, Cont.

B

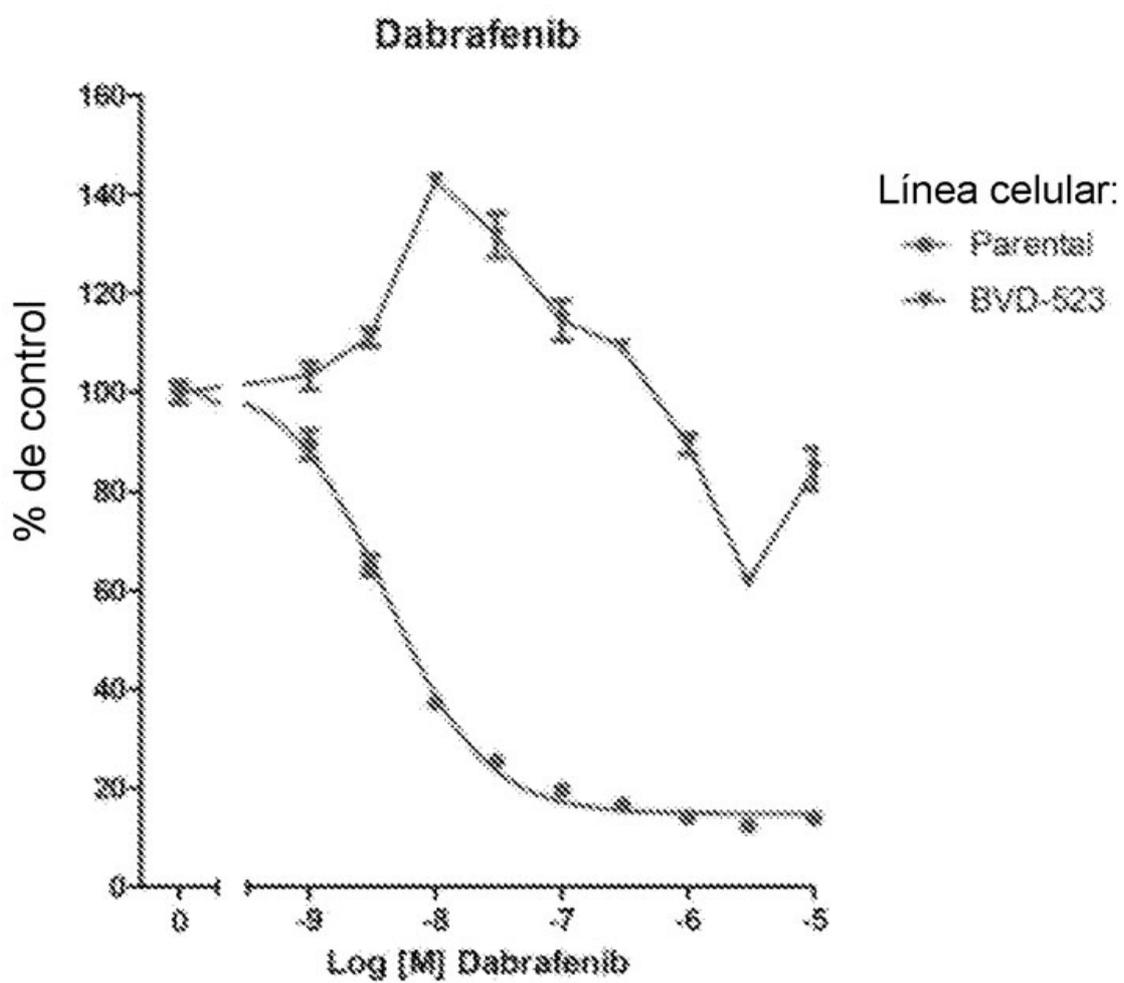
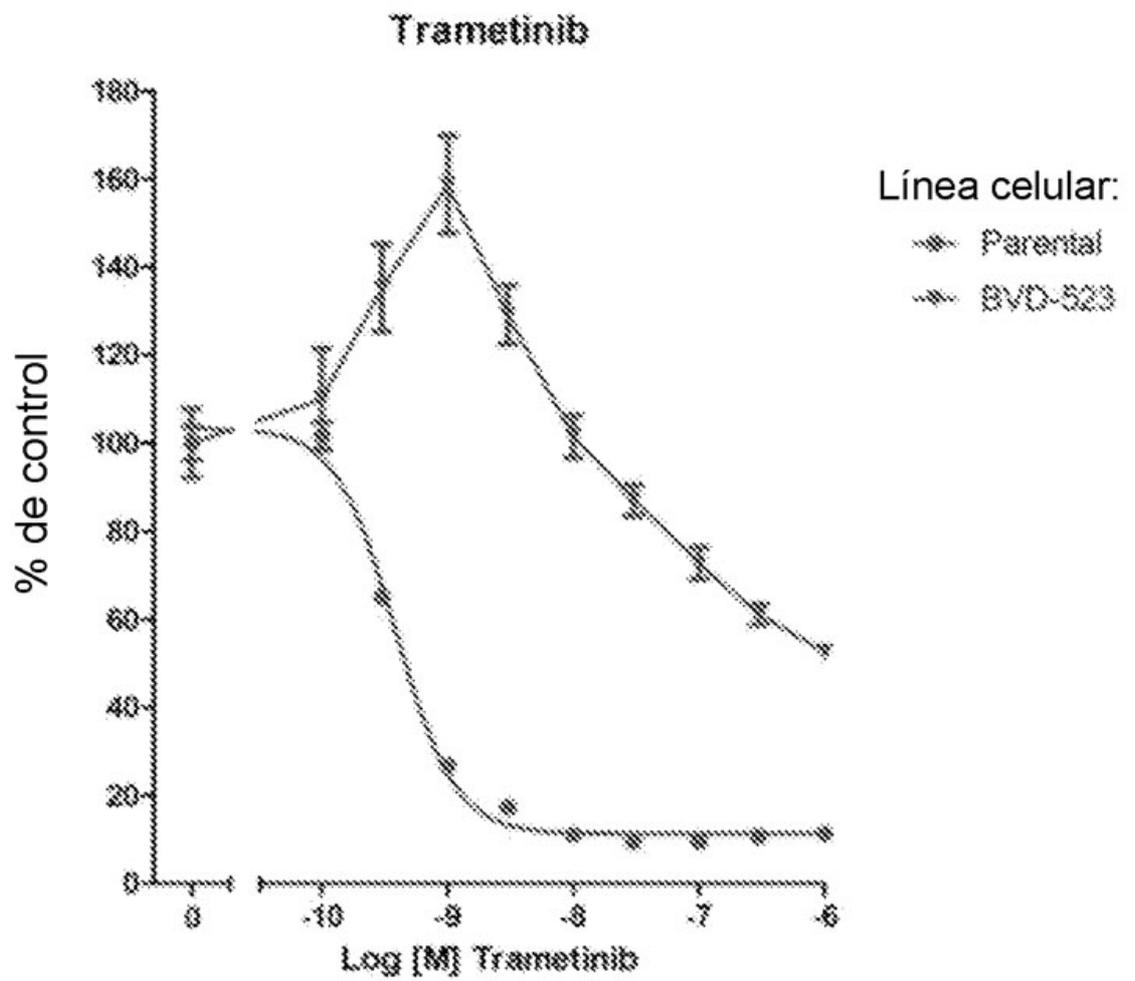


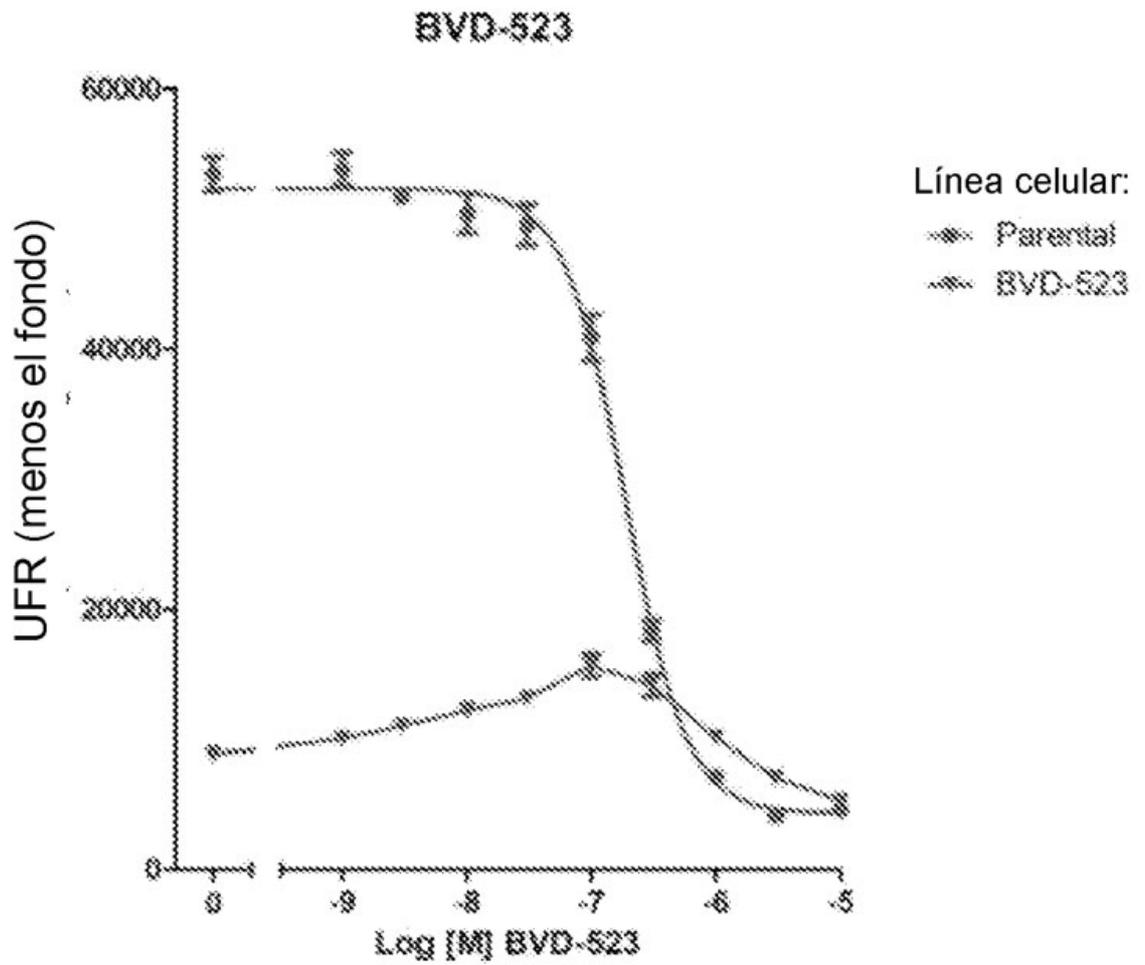
FIG. 5, Cont.

C



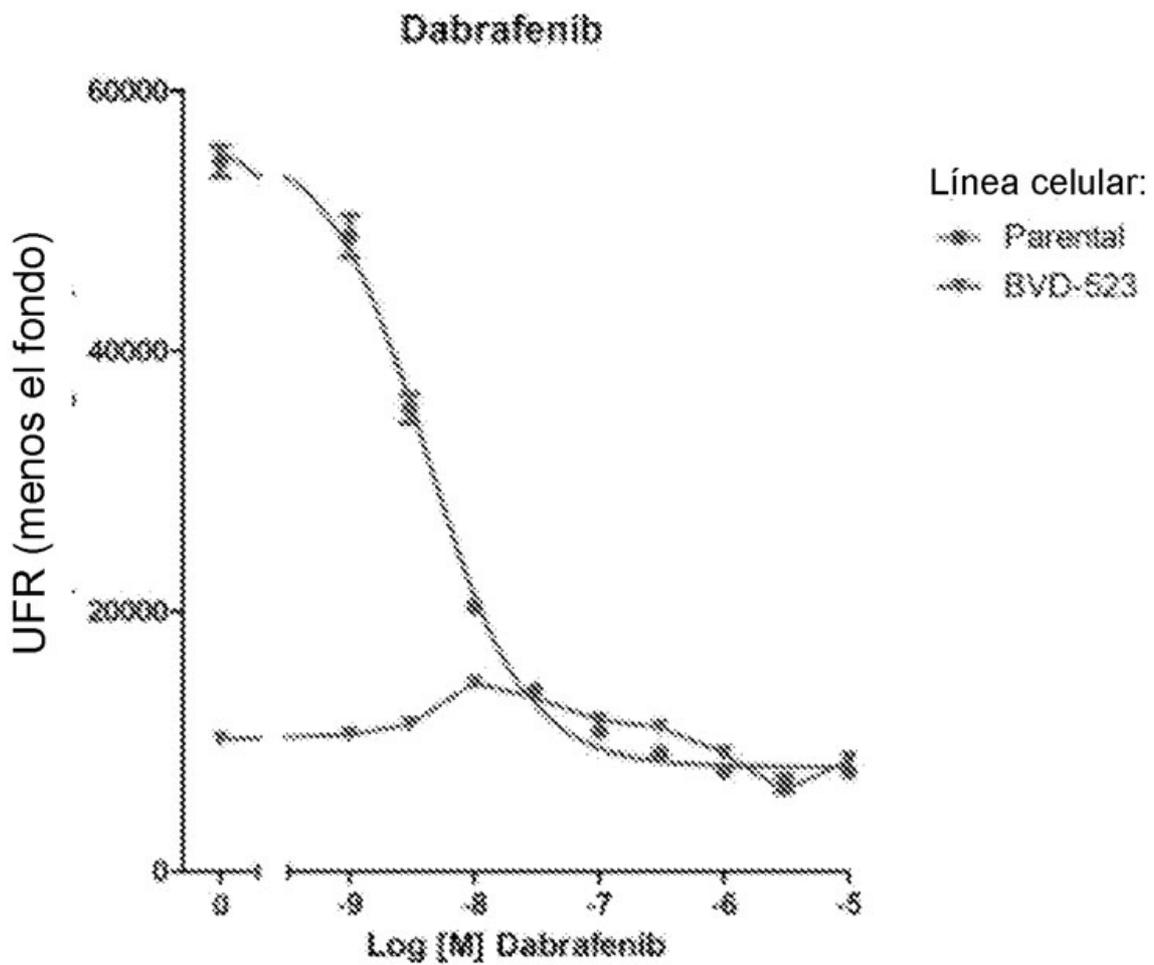
# FIG. 5, Cont.

## D



# FIG. 5, Cont.

# E



# FIG. 5, Cont.

# F

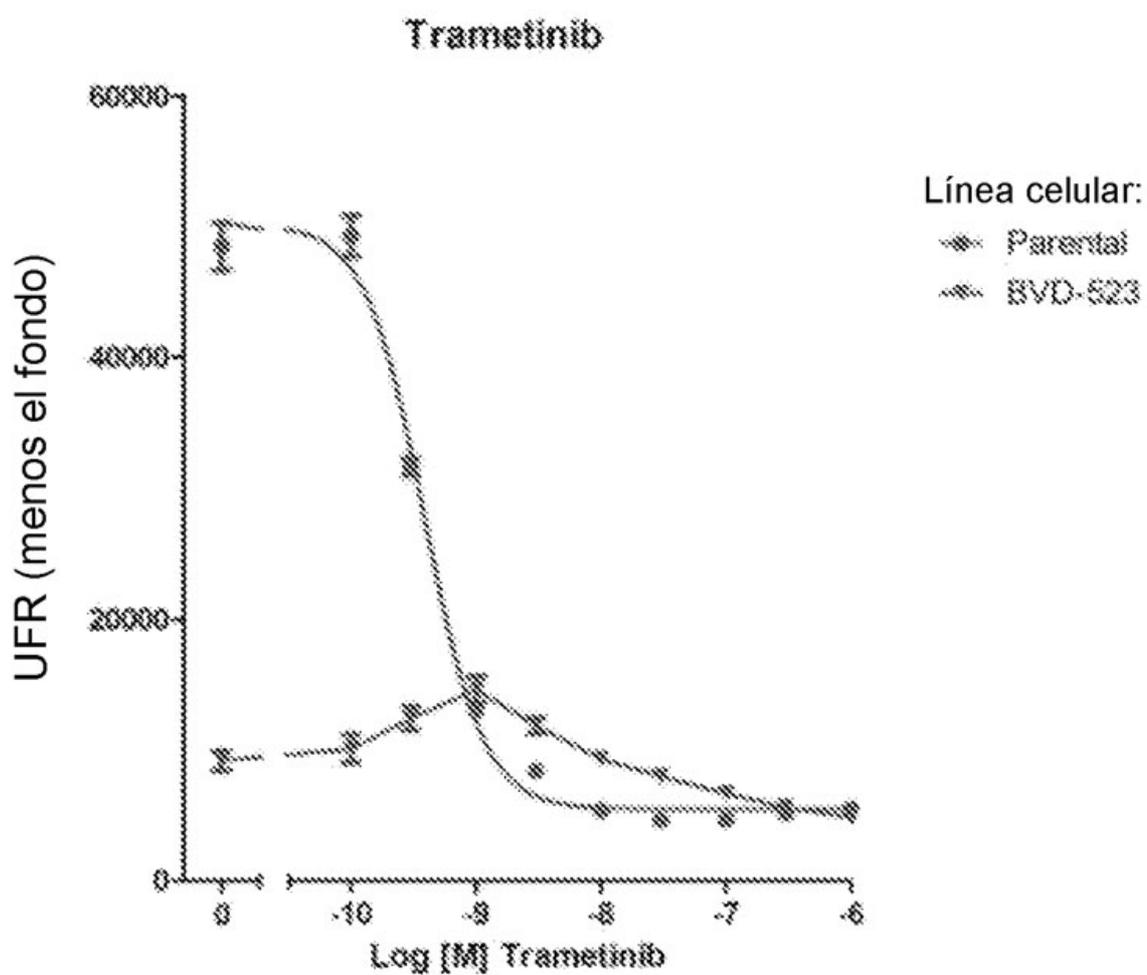


FIG. 5 Cont.

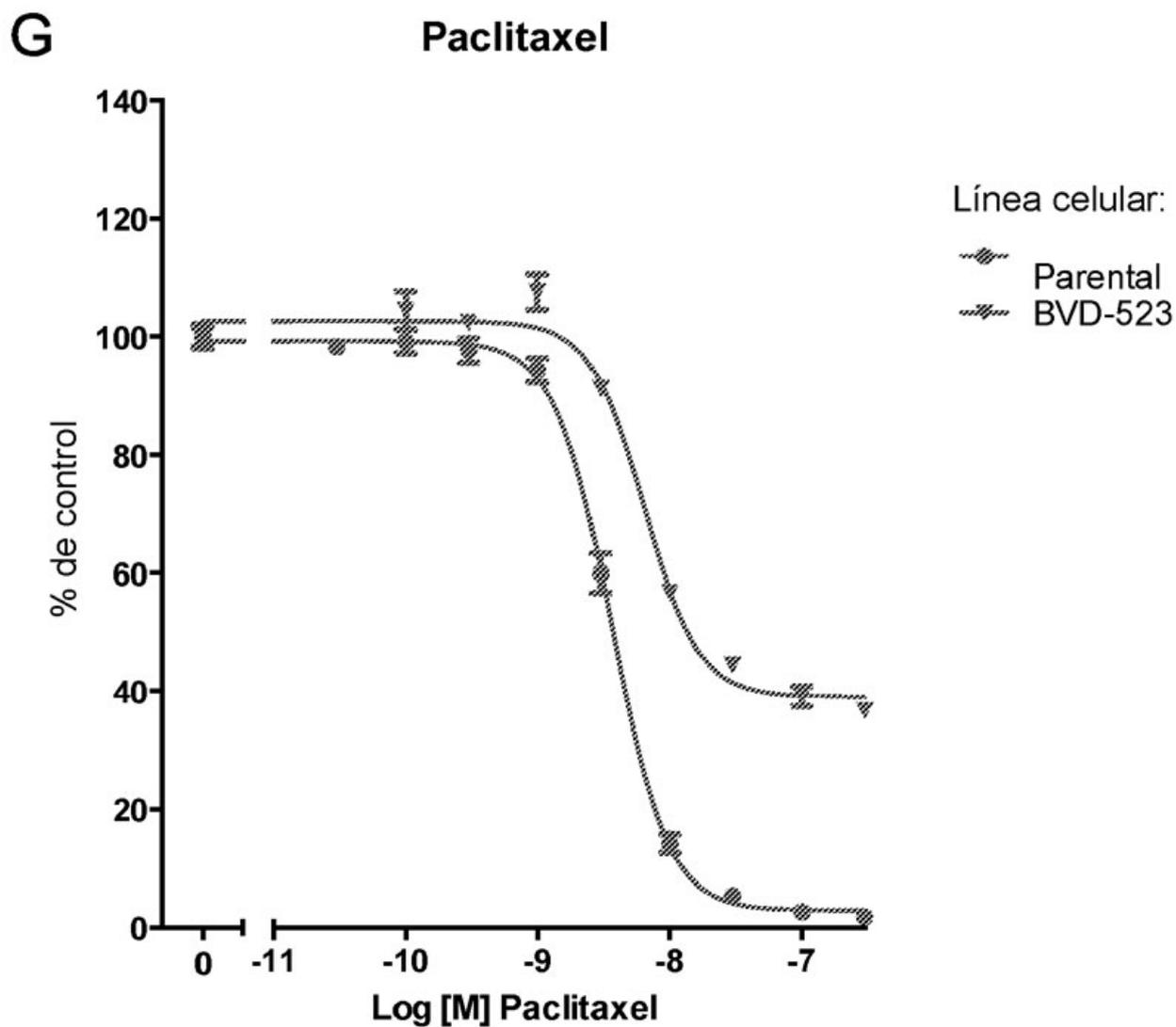


FIG. 5 Cont.

H

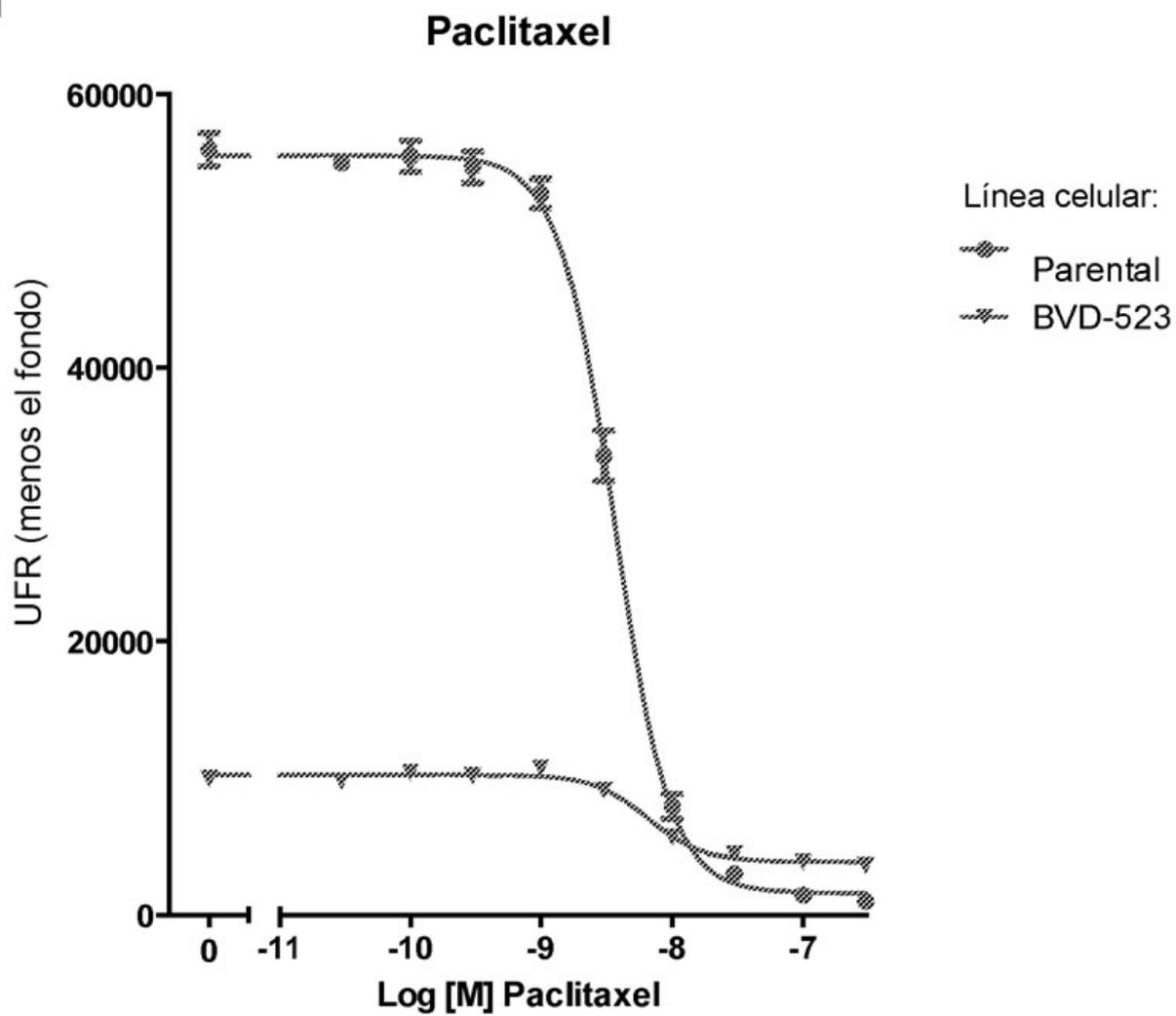
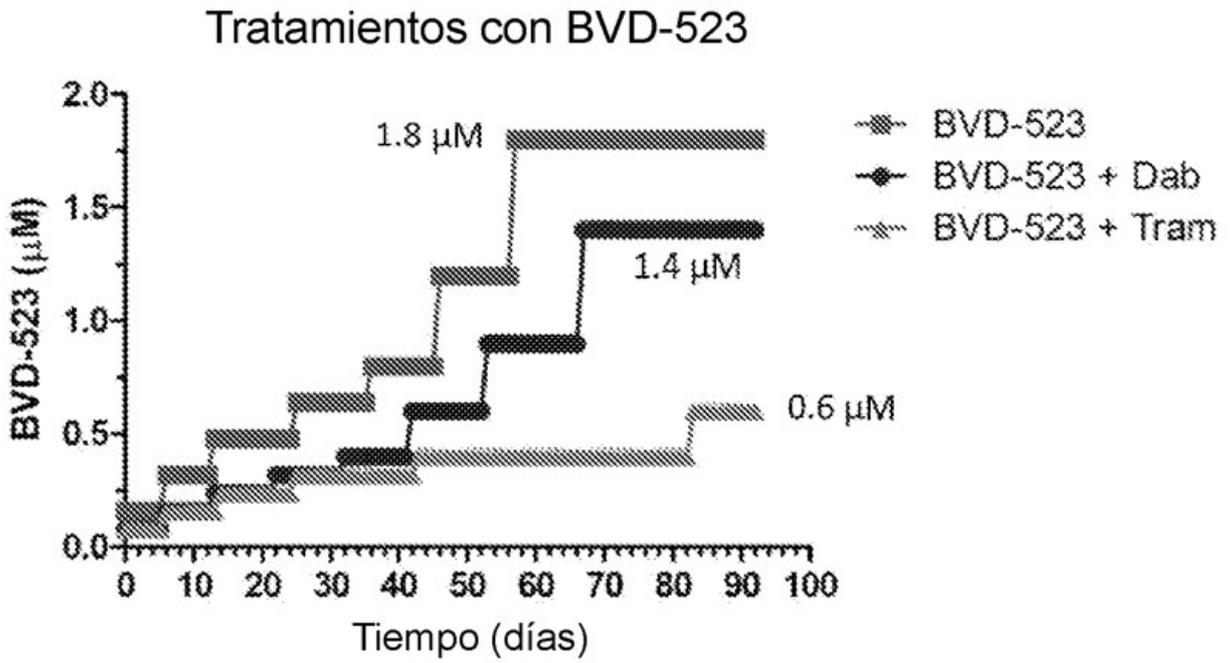




FIG. 6, Cont.

C



D

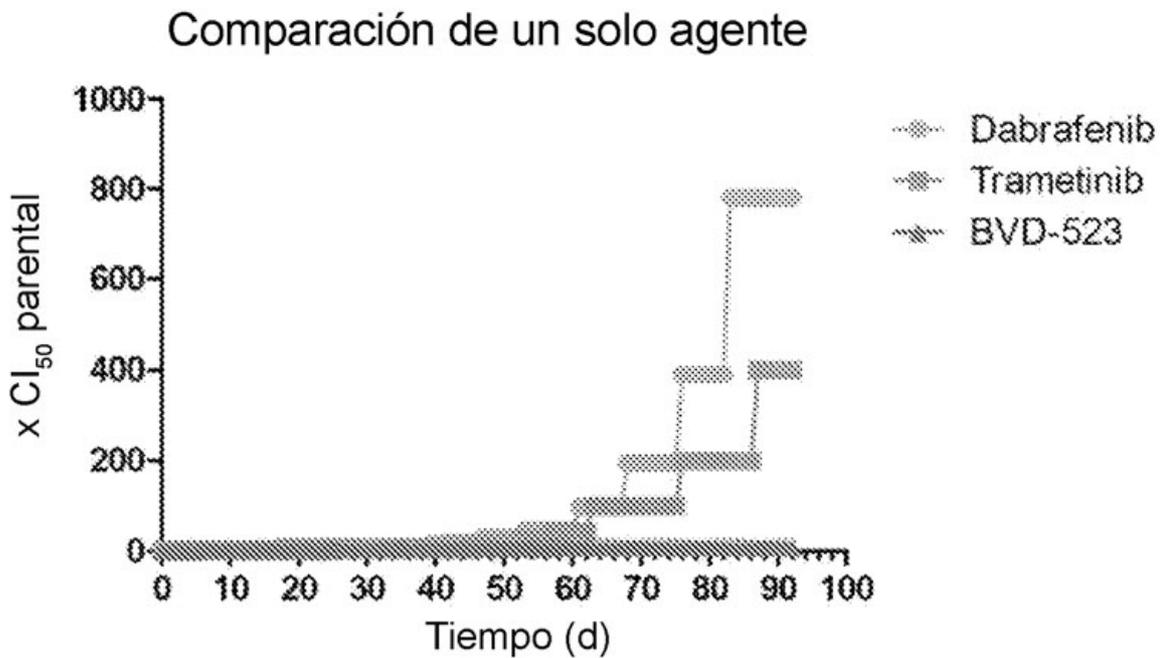


FIG. 7

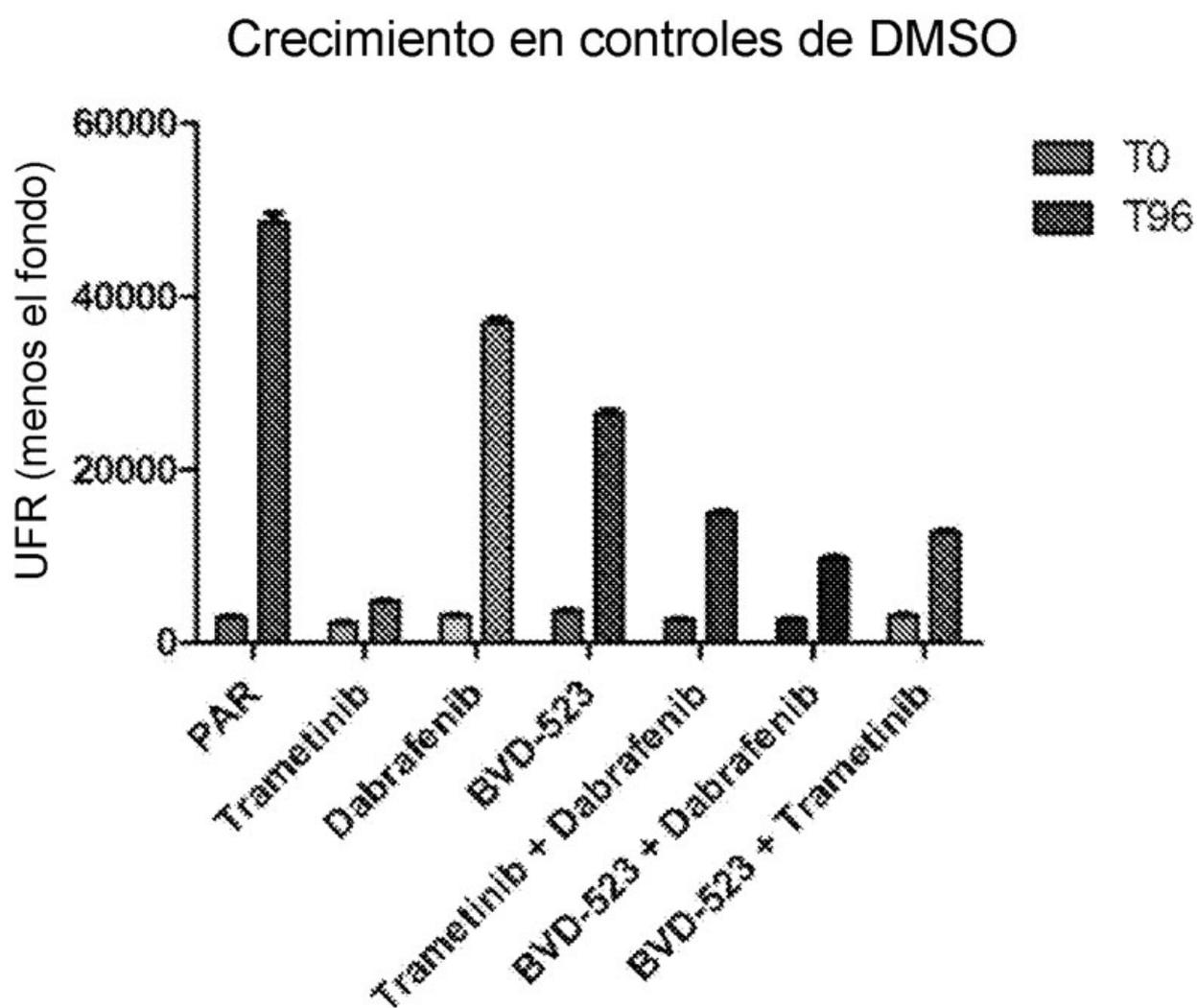


FIG. 8

A

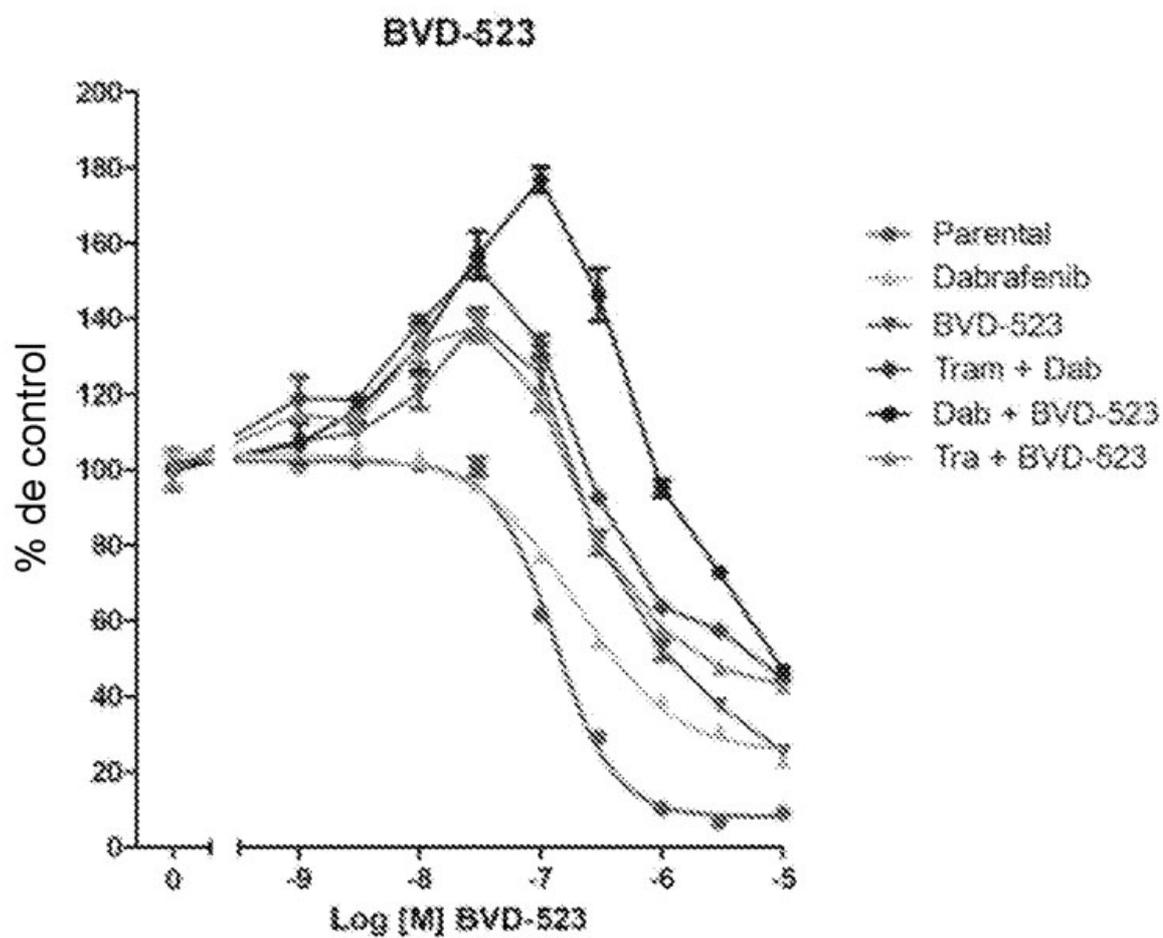


FIG. 8, Cont.

B

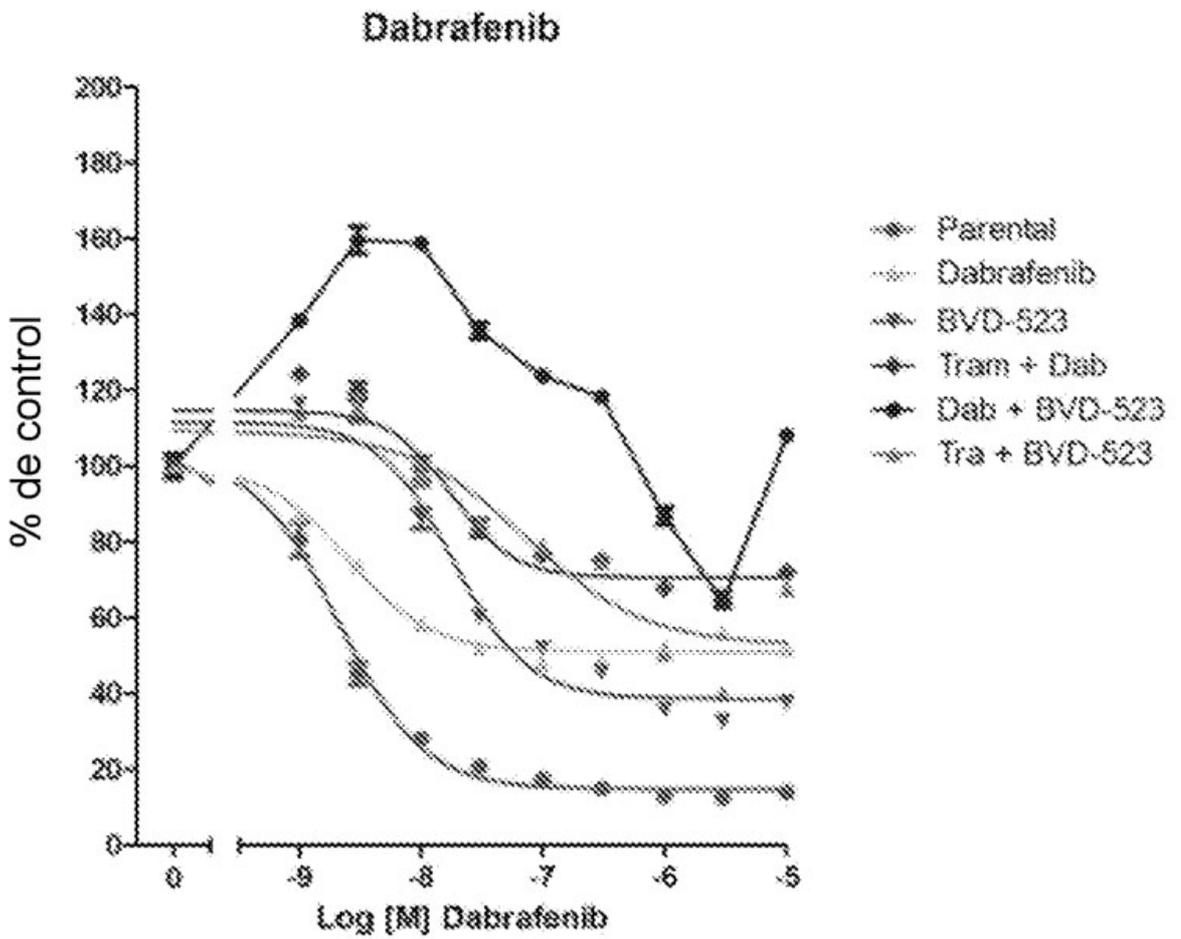
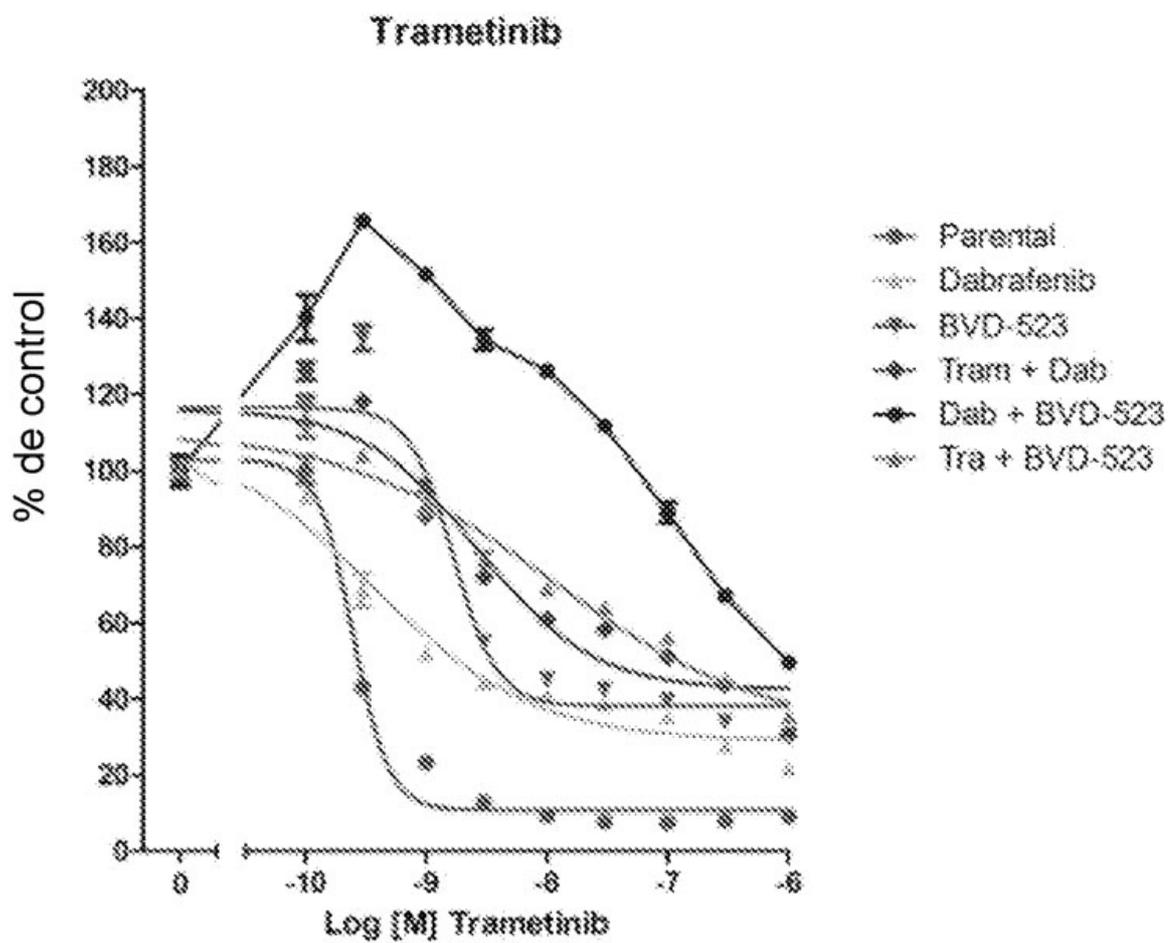


FIG. 8, Cont.

C



## FIG. 8, Cont.

D

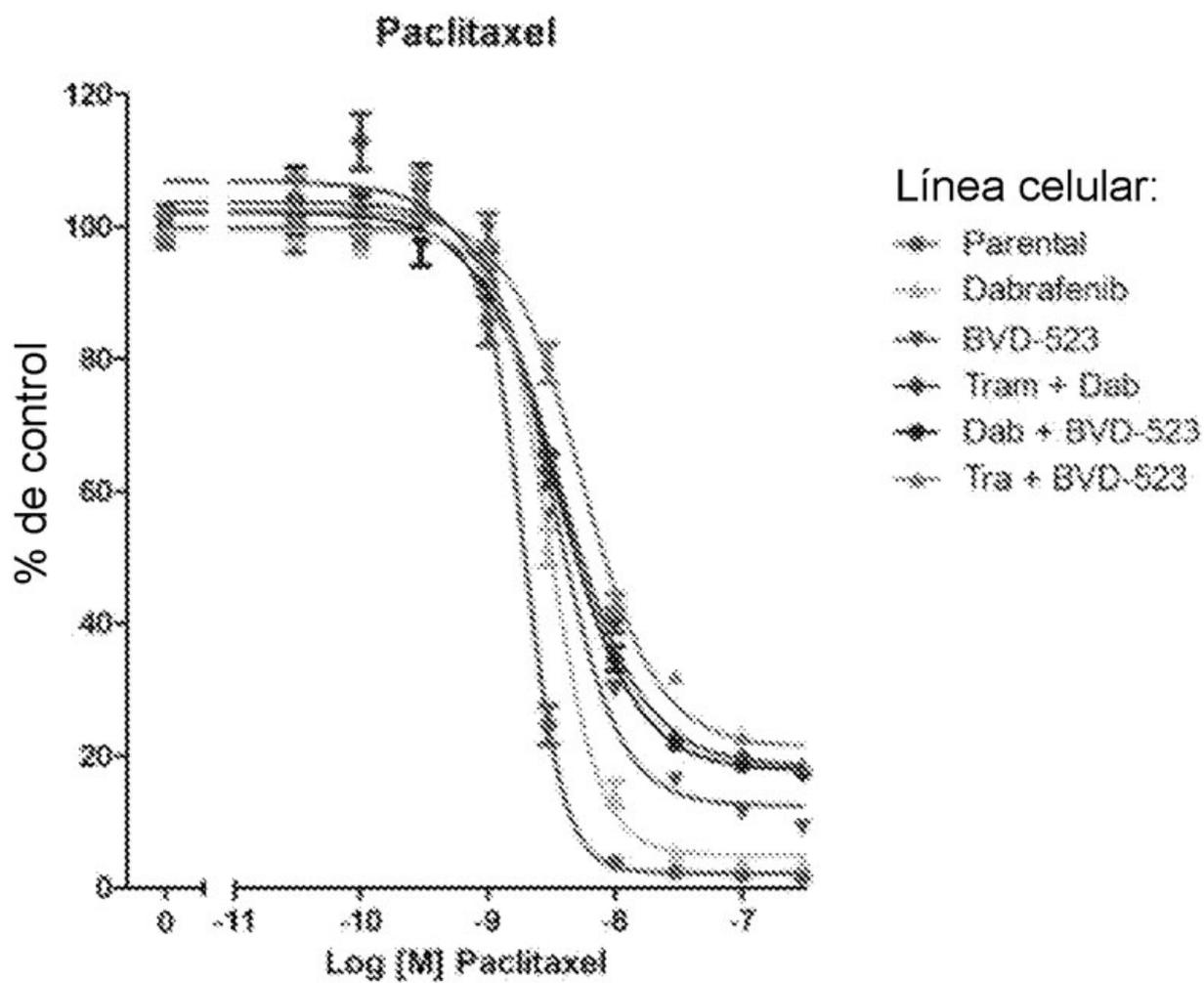
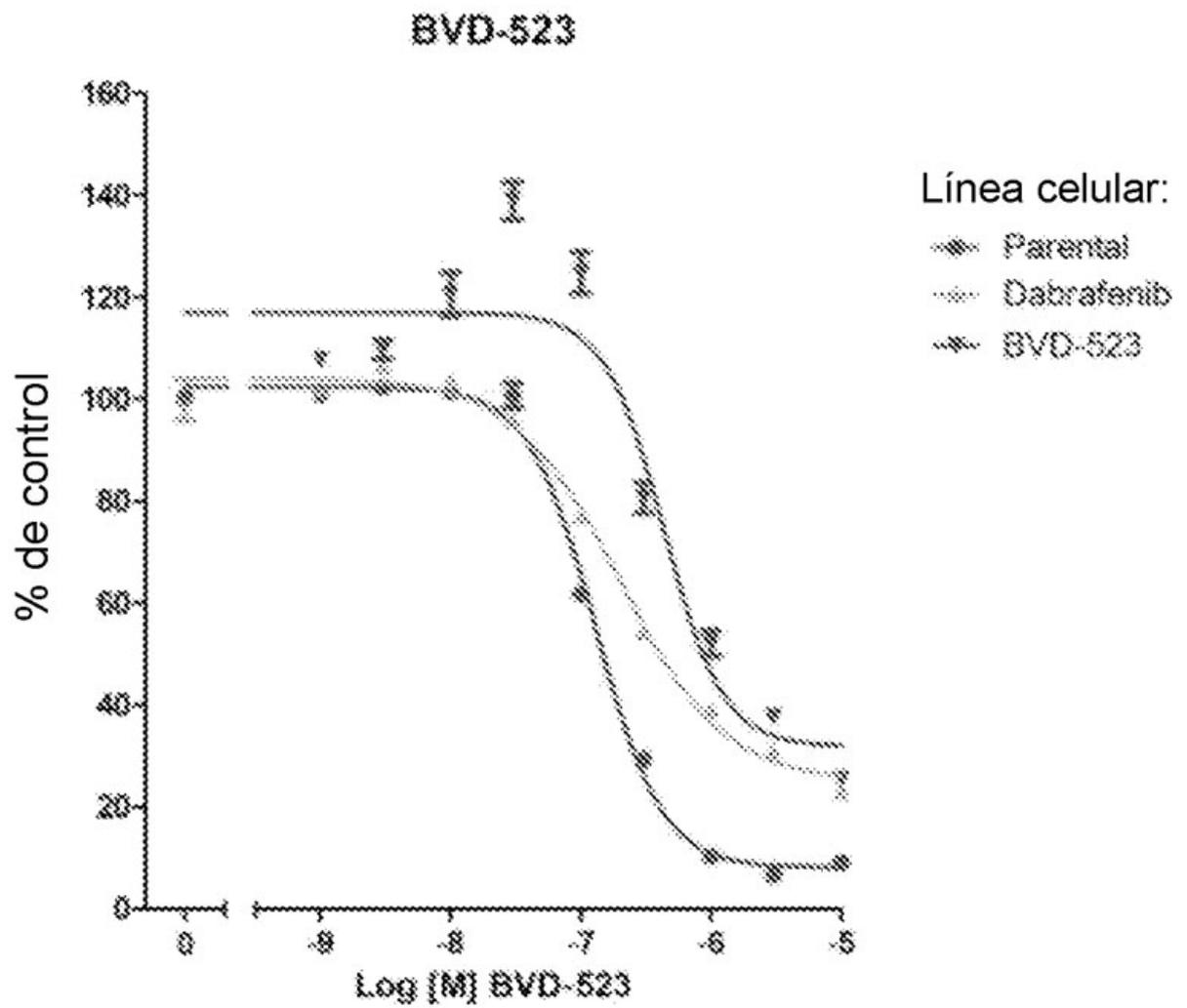


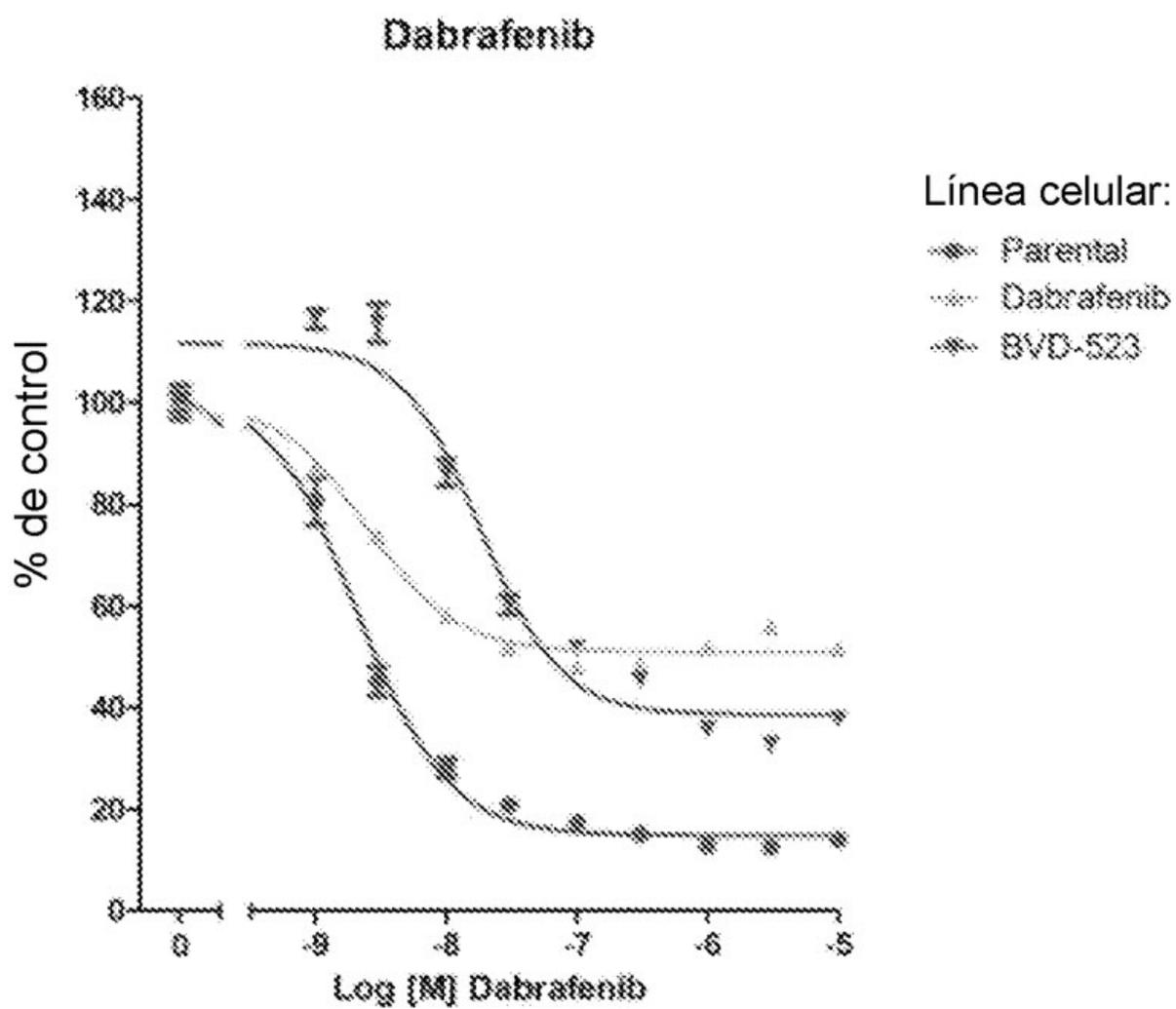
FIG. 9

A



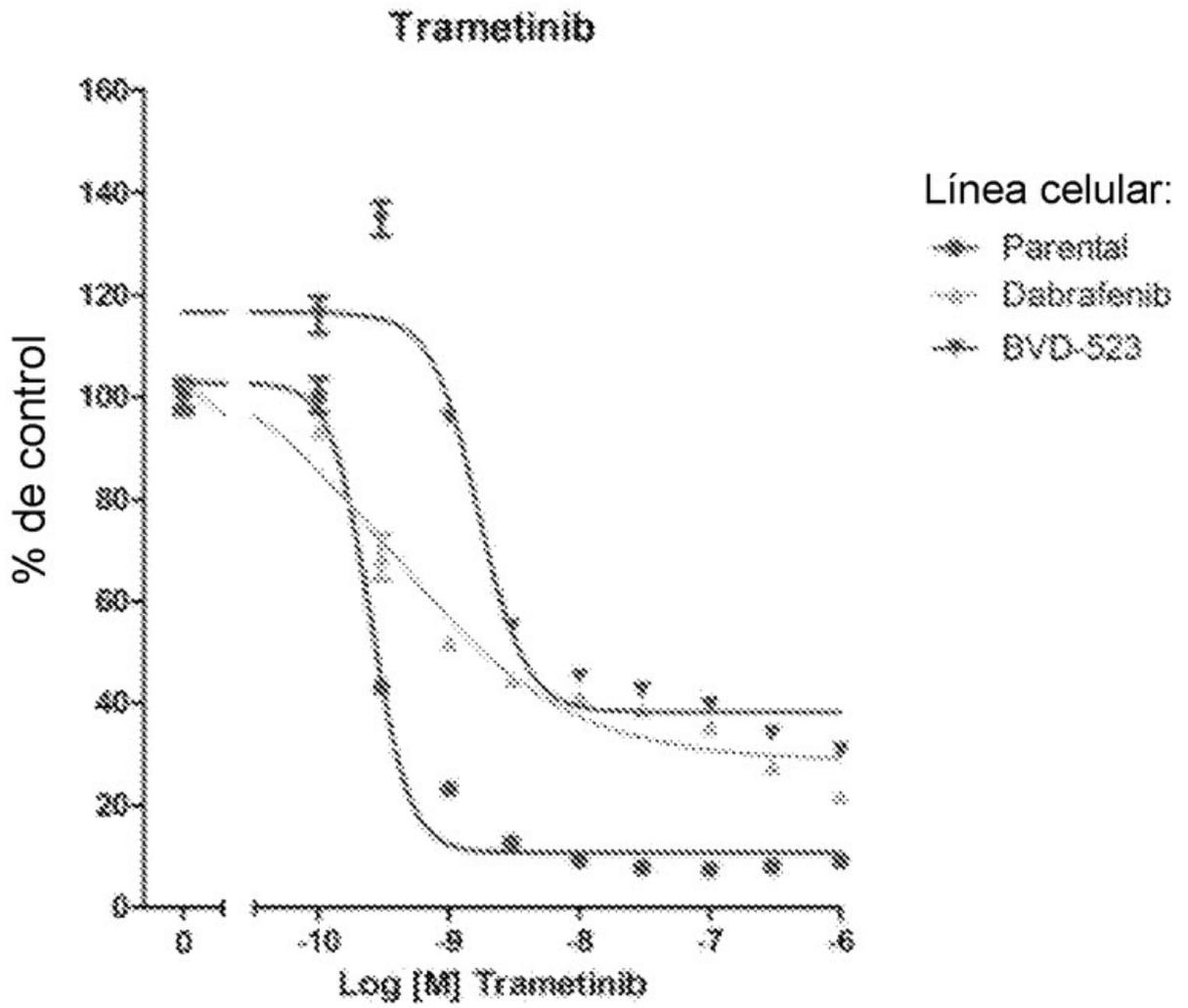
# FIG. 9, Cont.

**B**



# FIG. 9, Cont.

## C



# FIG. 9, Cont.

D

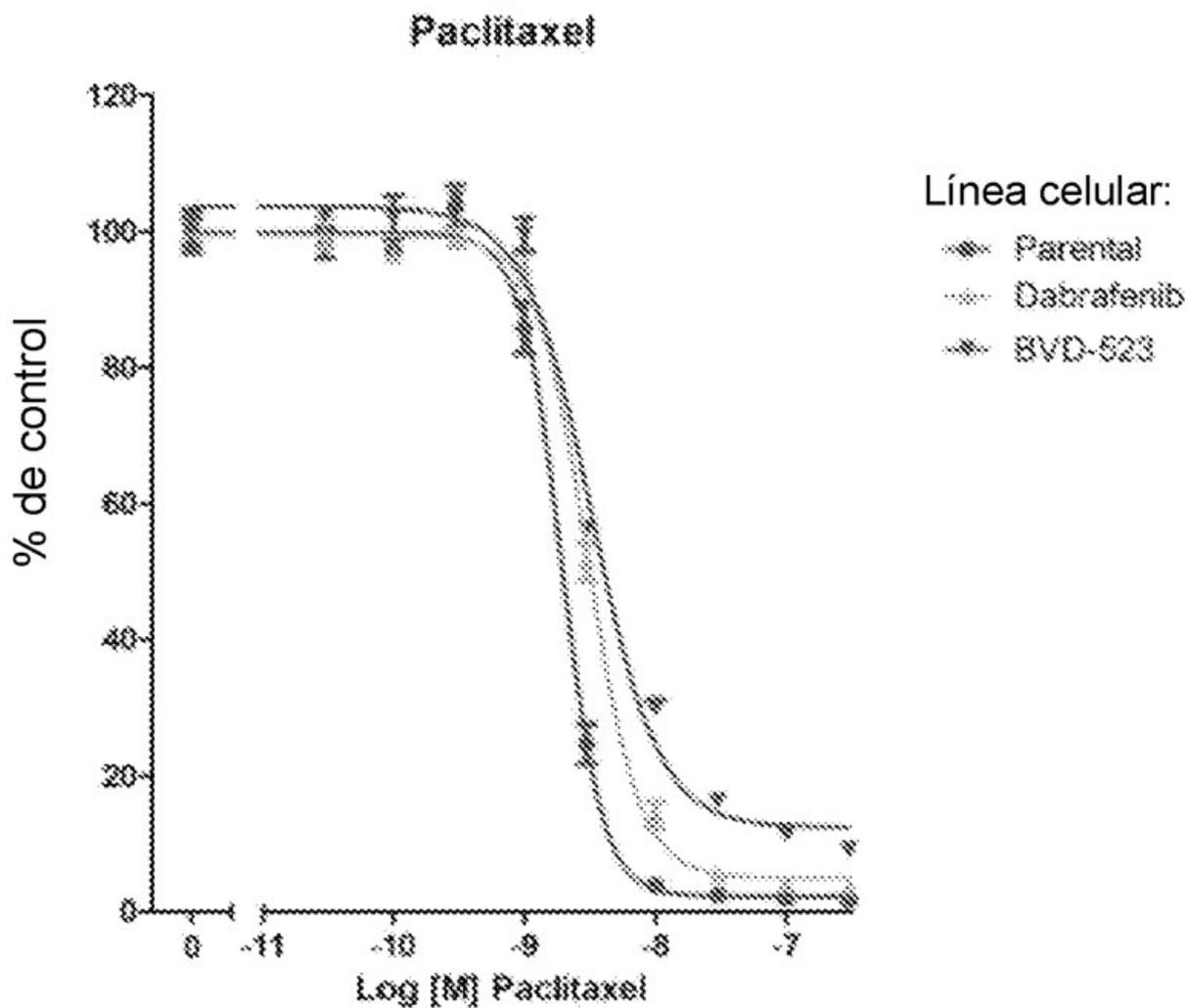


FIG. 10

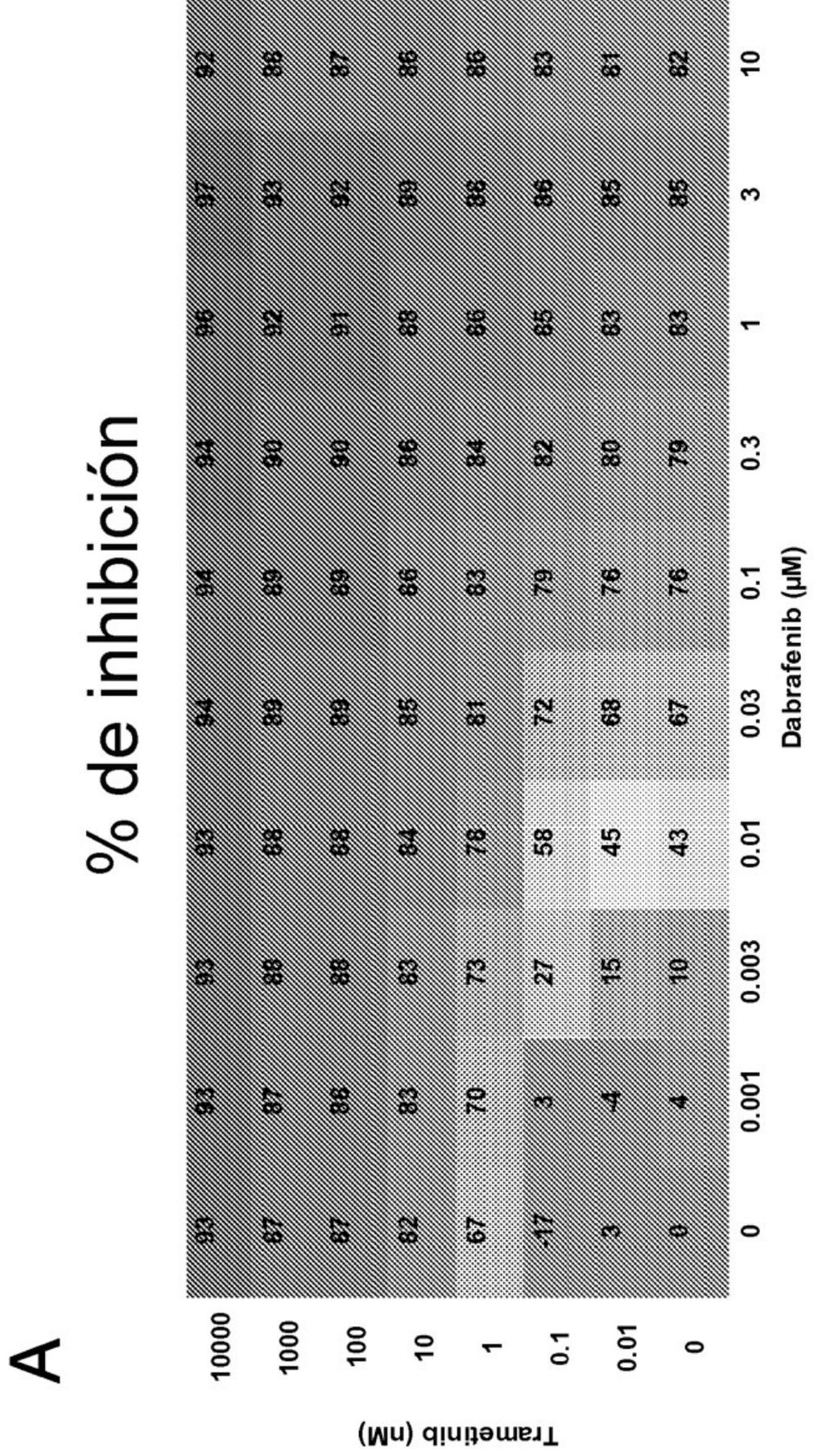


FIG. 10, Cont.

**B**

Exceso sobre Bliss:

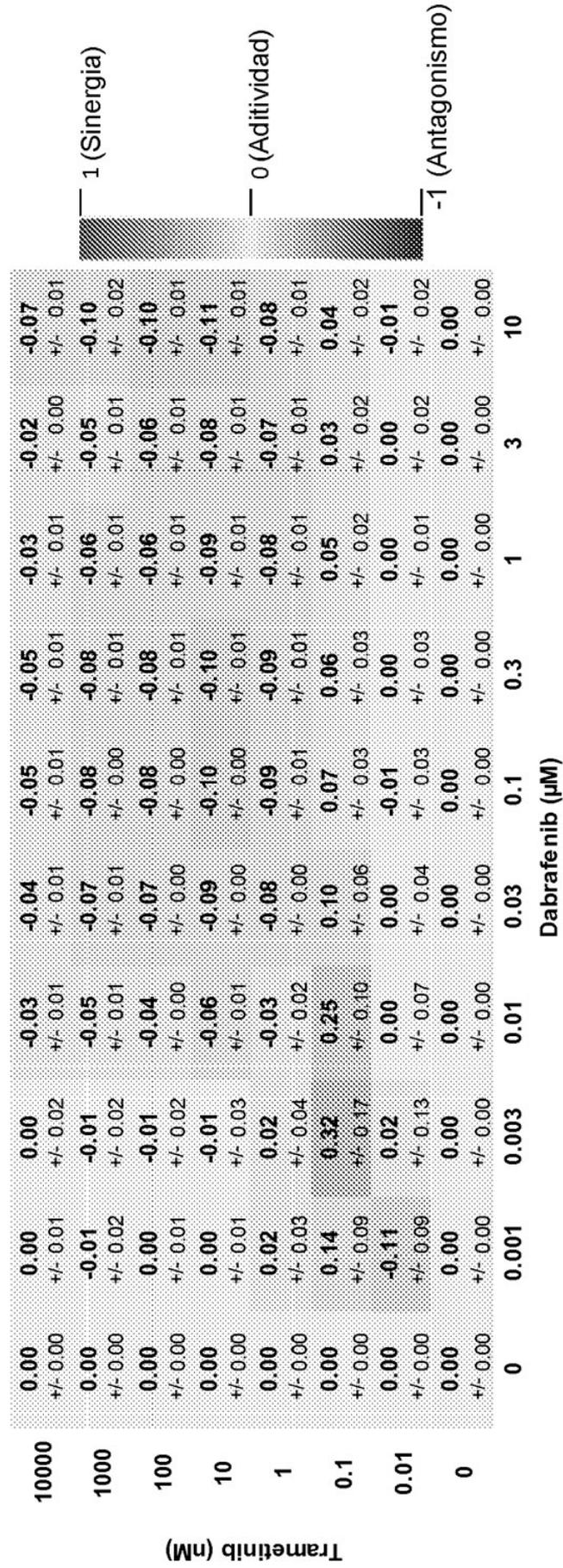
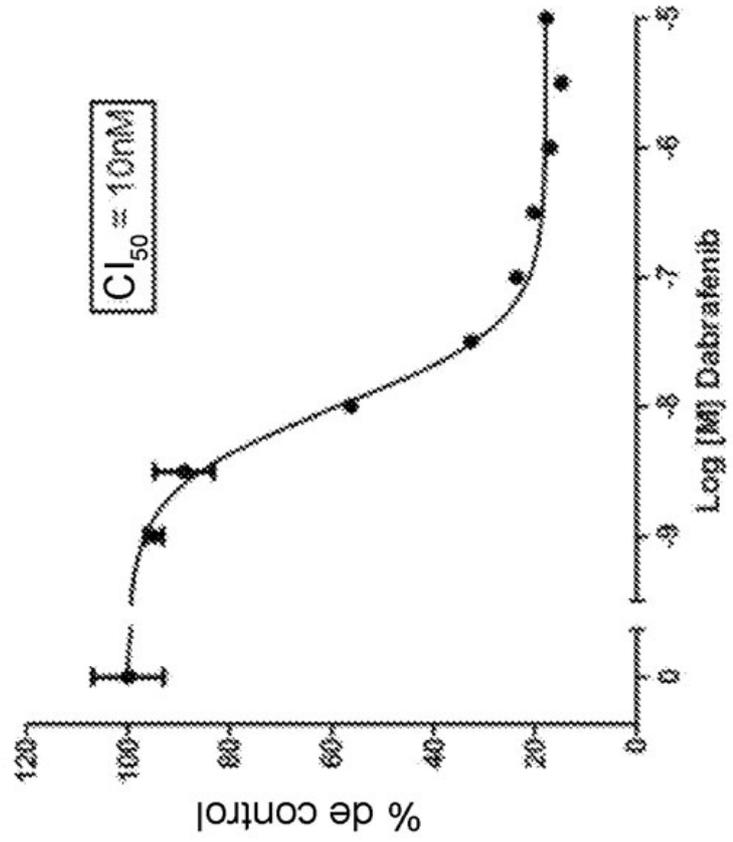


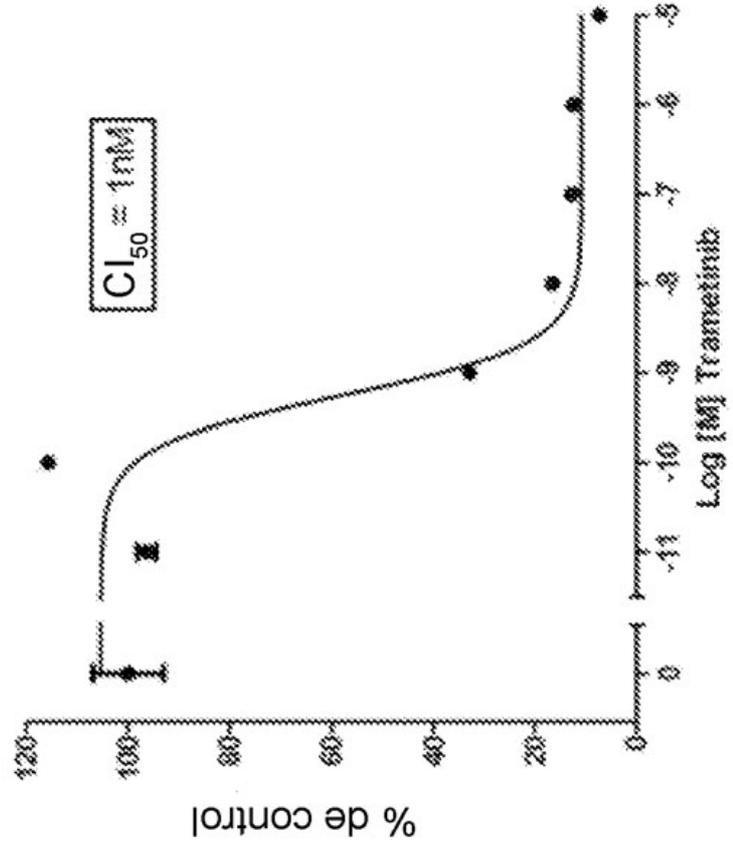
FIG. 10, Cont.

C

A375: Agente único de dabrafenib (Alamar Blue) A375: Agente único de trametinib (Alamar Blue)



D



# FIG. 10, Cont.

E

A375: Dabrafenib y Trametinib (Alamar Blue)

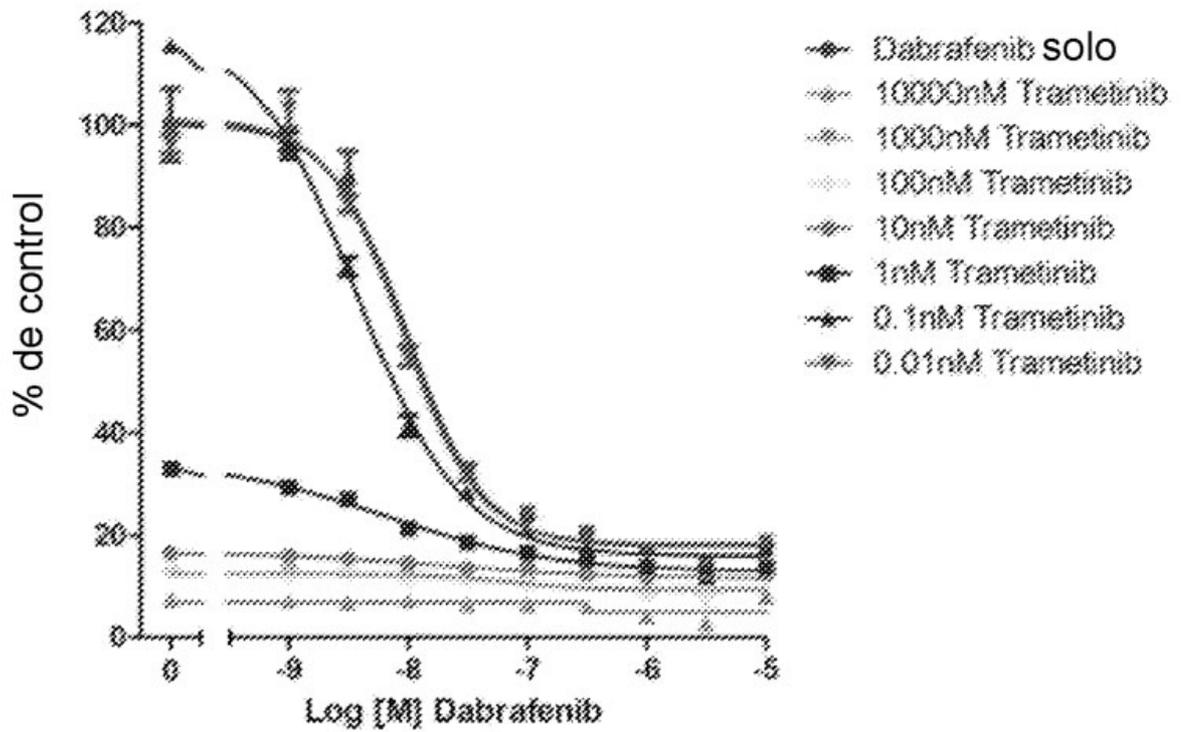


FIG. 11

A % de inhibición:

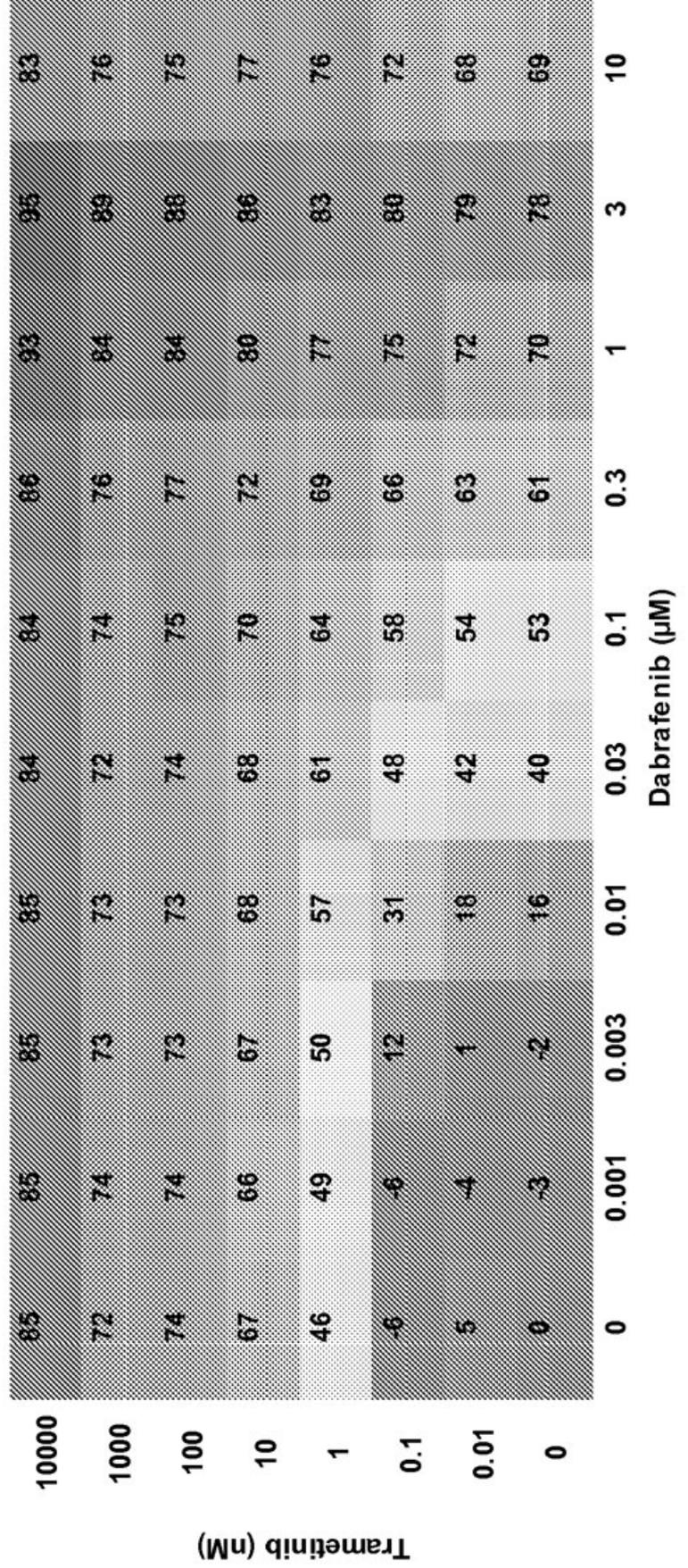
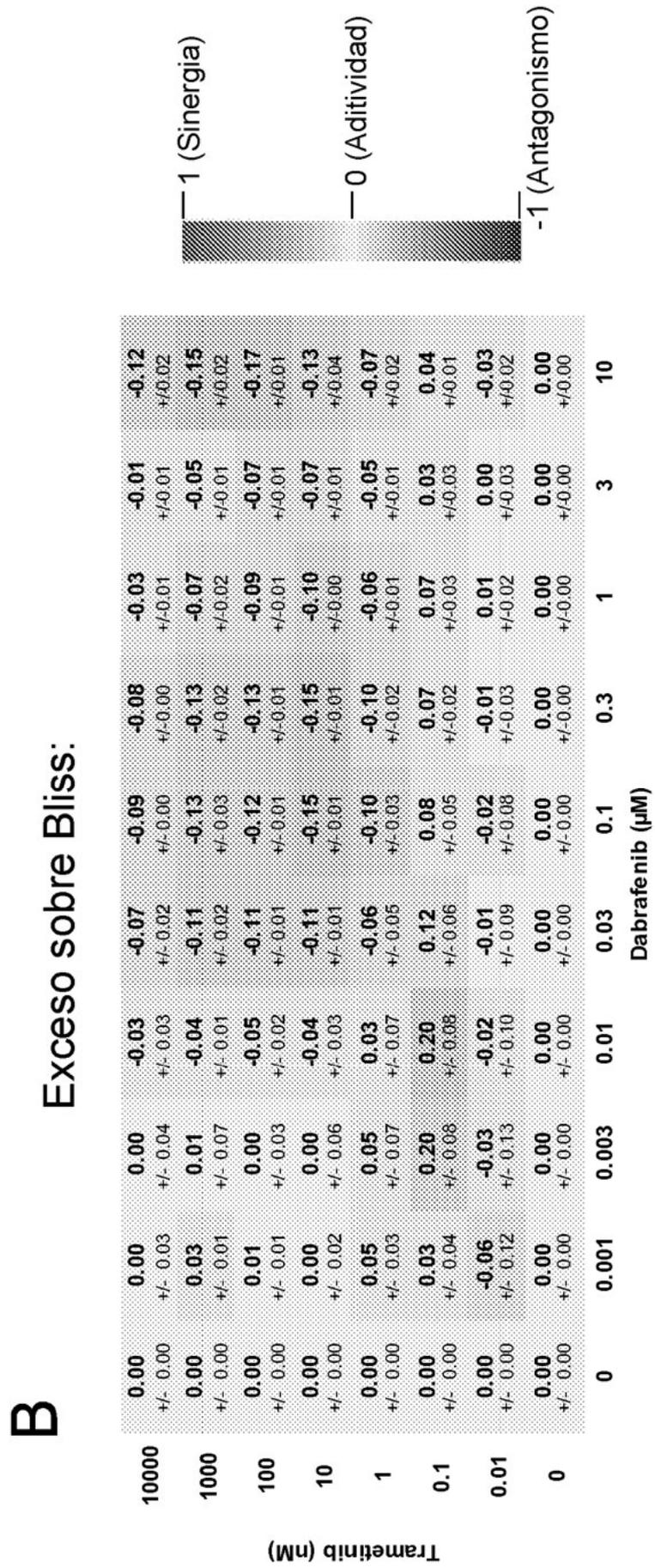


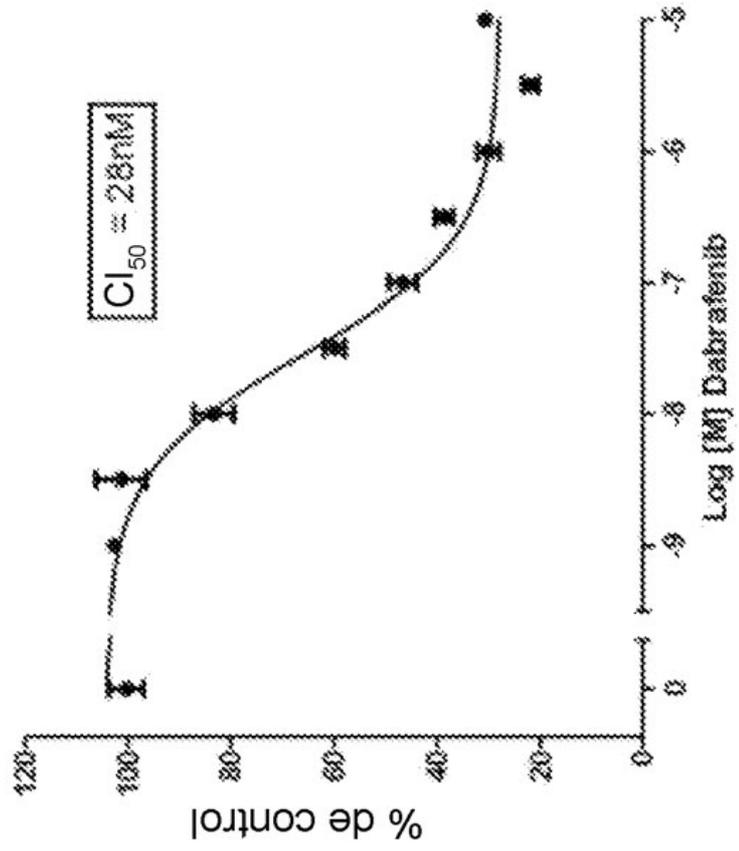
FIG. 11, Cont.



# FIG. 11, Cont.

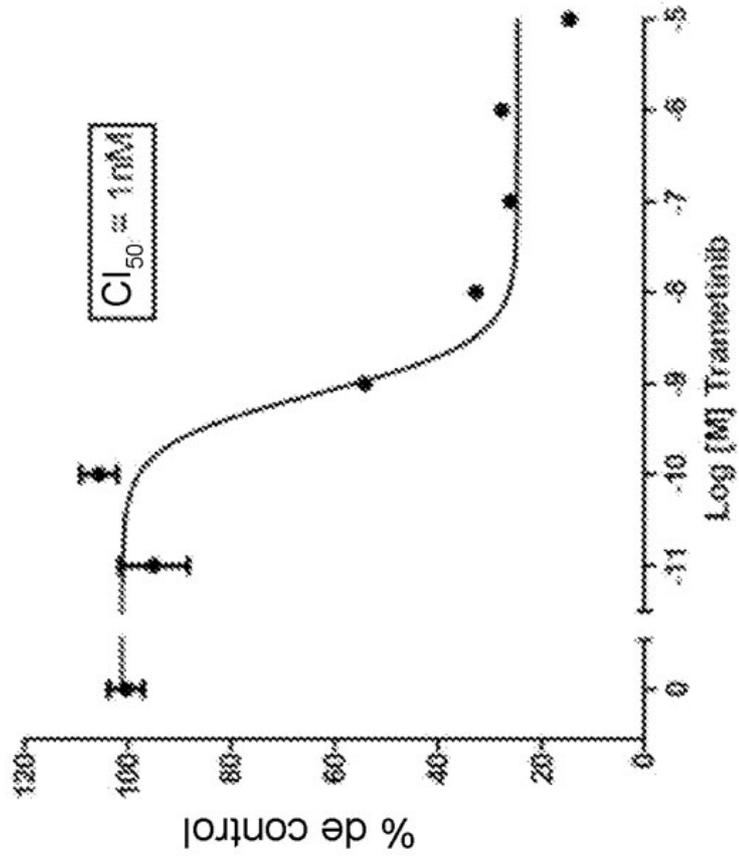
**C**

A375: Agente único de dabrafenib (CellTiter-Glo)



**D**

A375: Agente único de trametinib (CellTiter-Glo)



# FIG. 11, Cont.

**E**

**A375: Dabrafenib y Trametinib (CellTiter-Glo)**

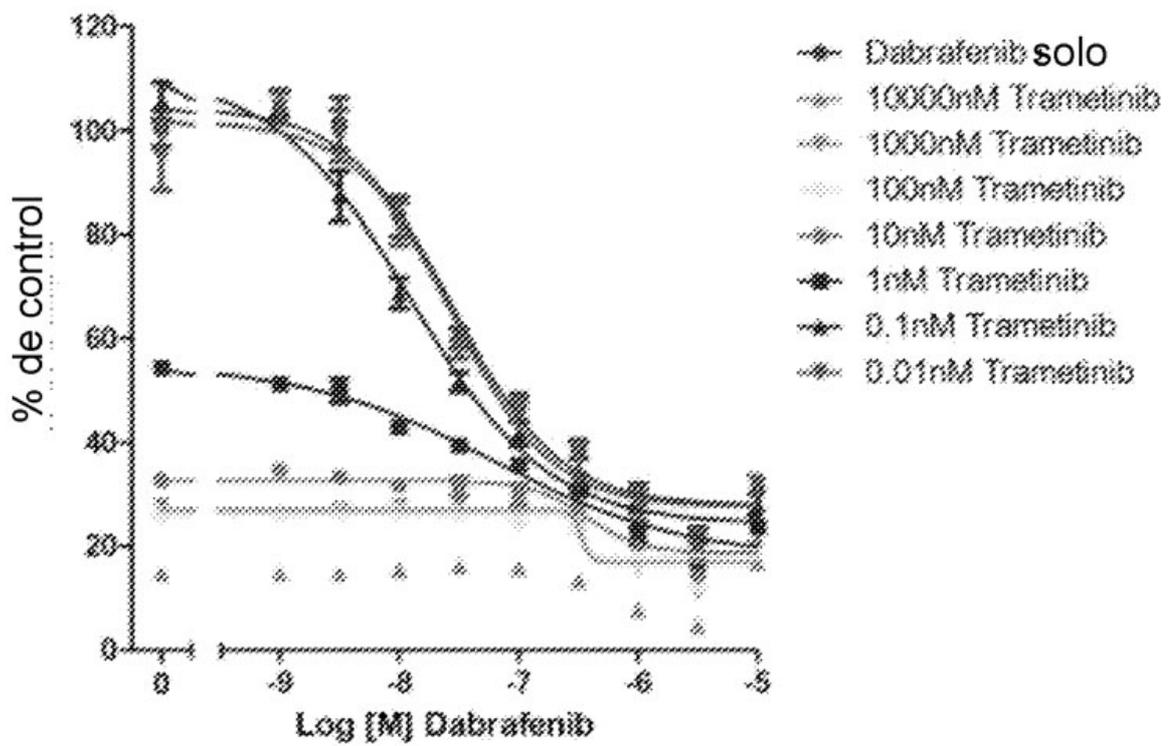


FIG. 12

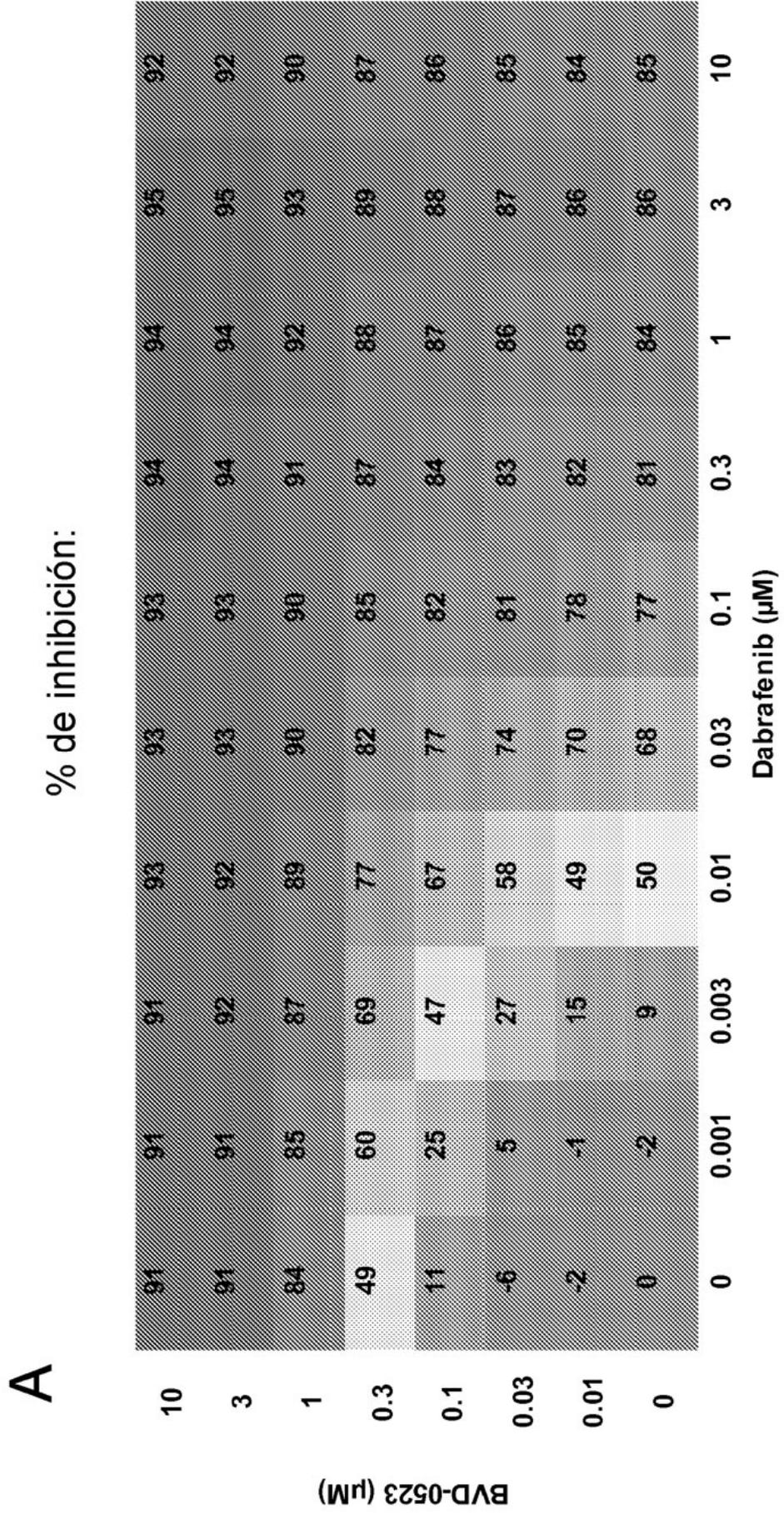


FIG. 12, Cont.

**B**

Exceso sobre Bliss:

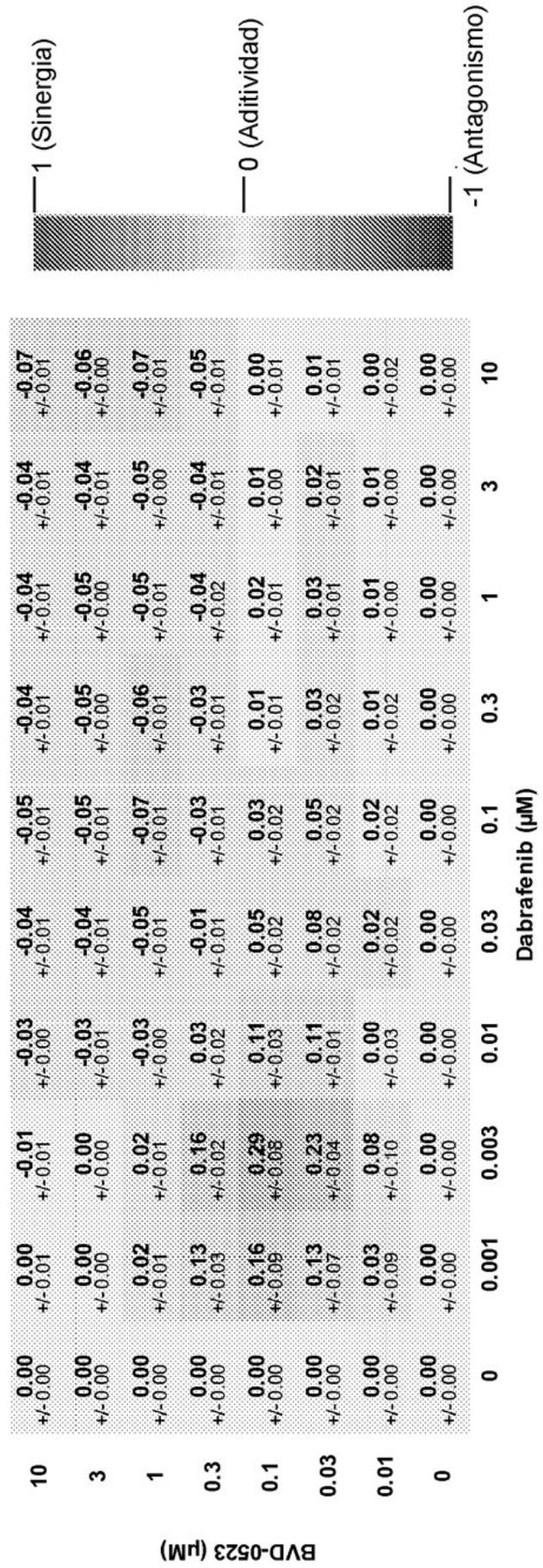
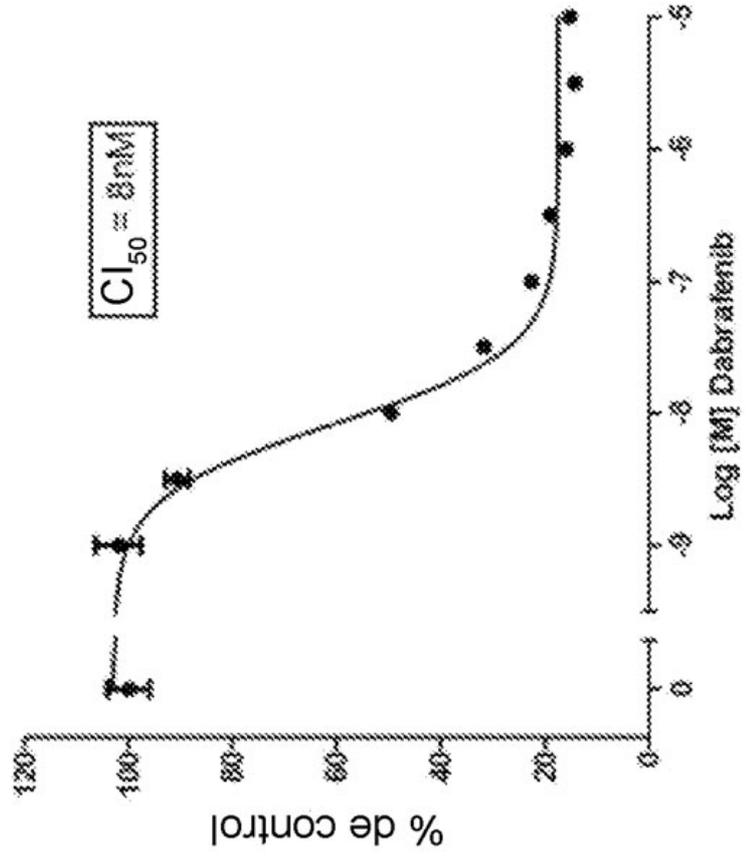


FIG. 12, Cont.

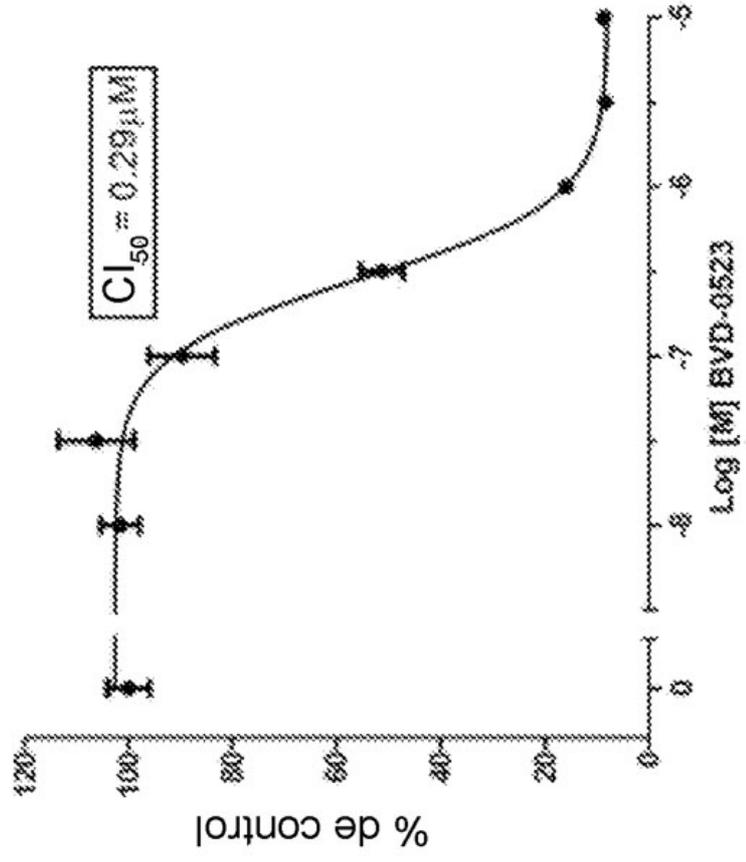
C

A375: Agente único de dabrafenib (Alamar Blue)



D

A375: Agente único de BVD-0523 (Alamar Blue)



# FIG. 12, Cont.

E

A375: Dabrafenib y BVD-0523 (Alamar Blue)

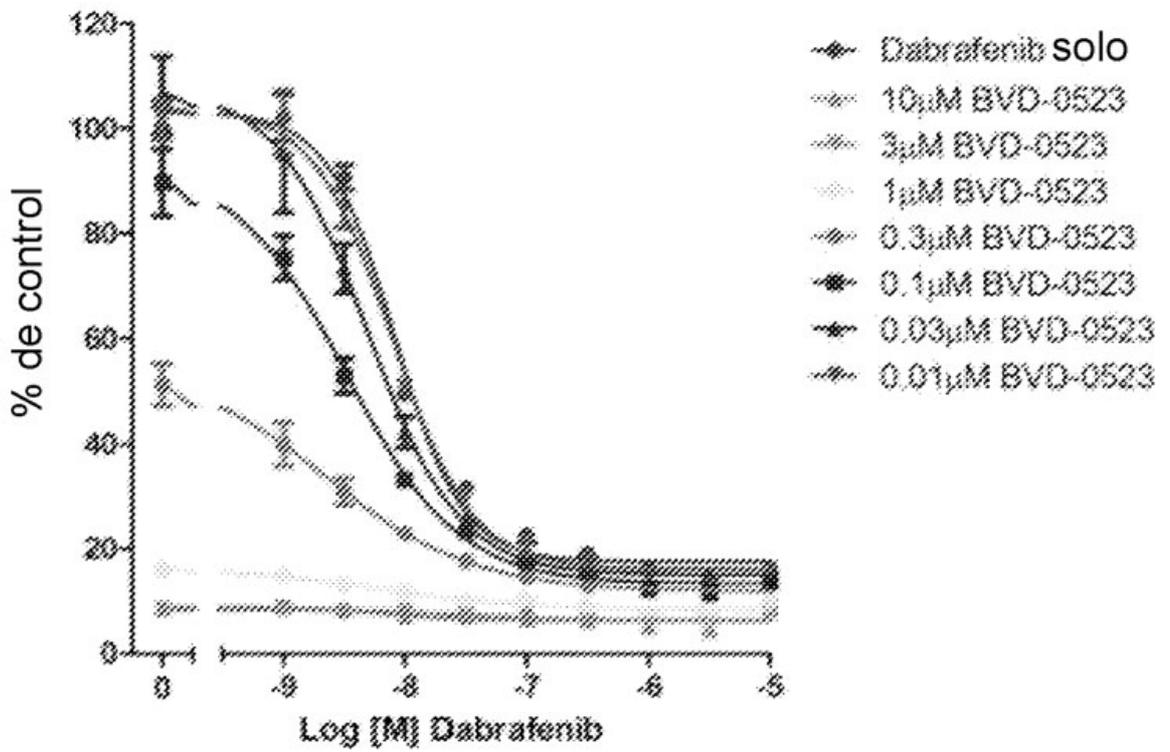


FIG. 13

A

% de inhibición:

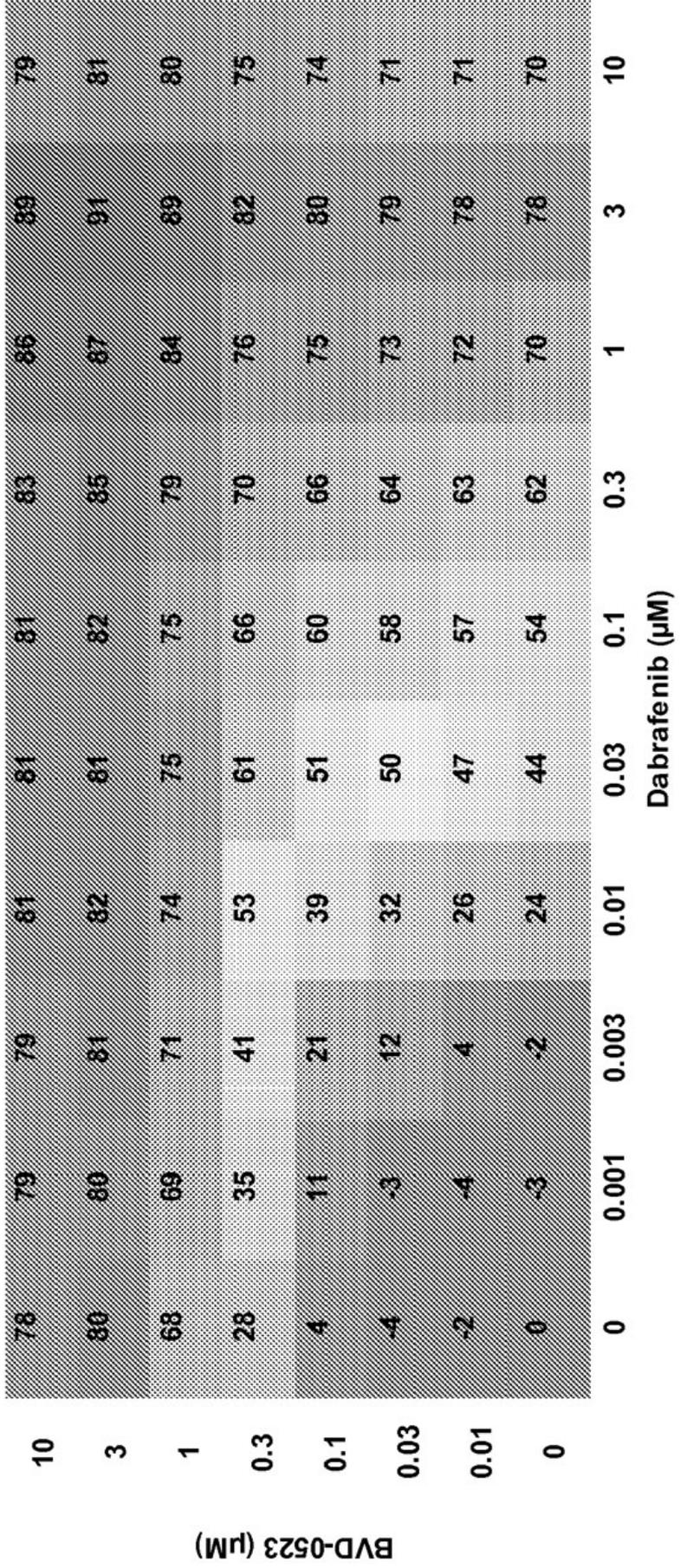


FIG. 13, Cont.

**B**

Exceso sobre Bliss:

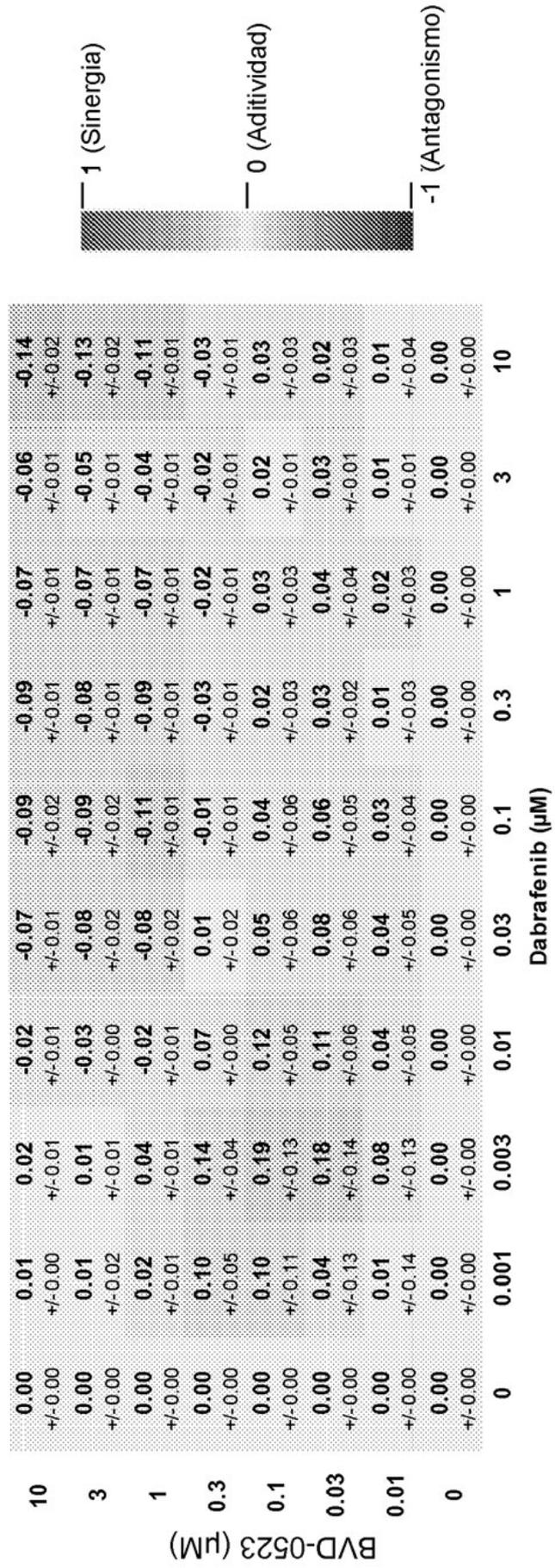
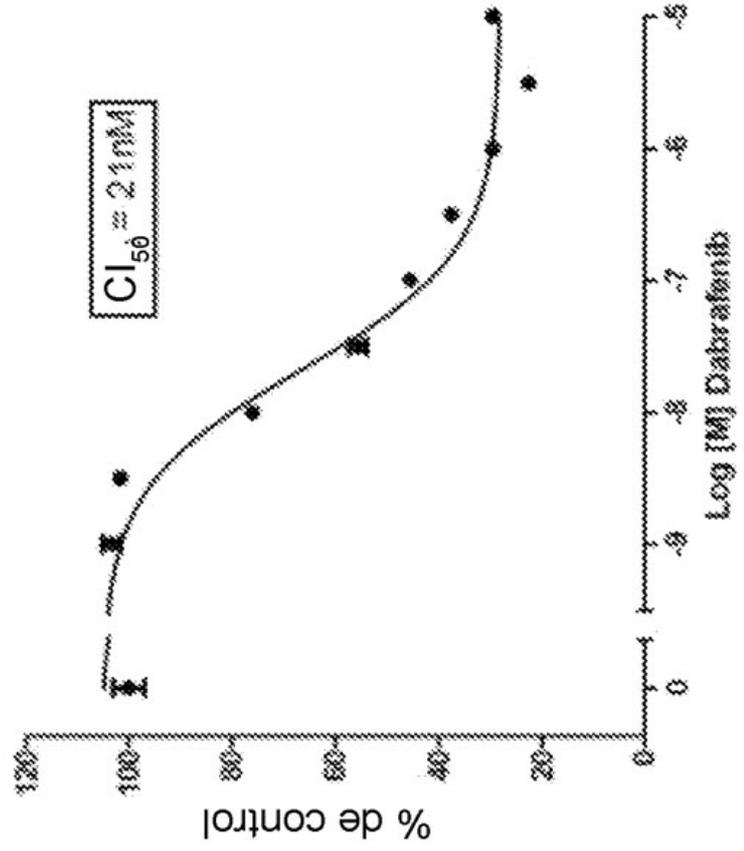


FIG. 13, Cont.

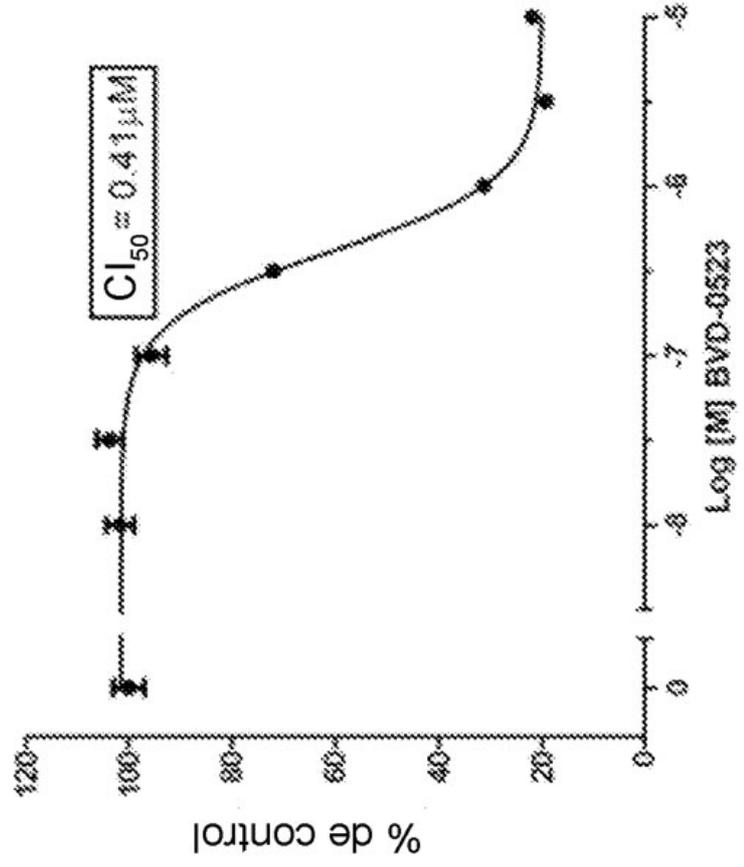
C

A375: Agente único de dabrafenib



D

A375: Agente único de BVD-0523 (CellTiter-Glo)



# FIG. 13, Cont.

E

A375: Dabrafenib y BVD-0523 (CellTiter-Glo)

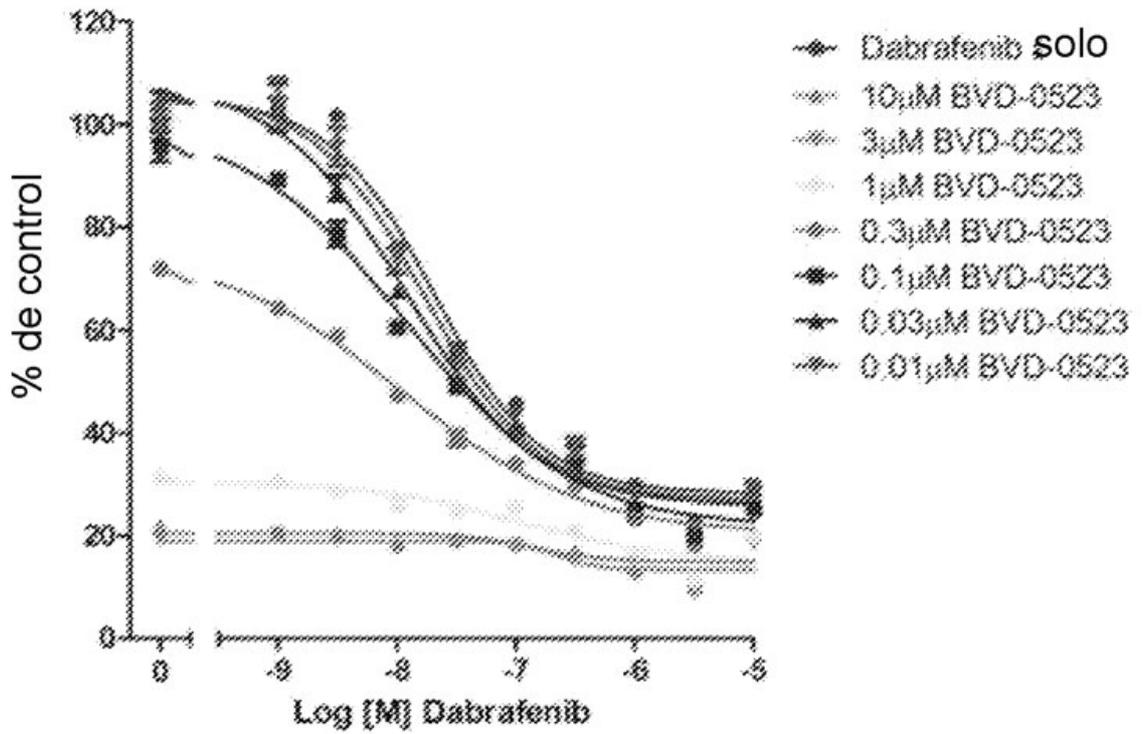


FIG. 14

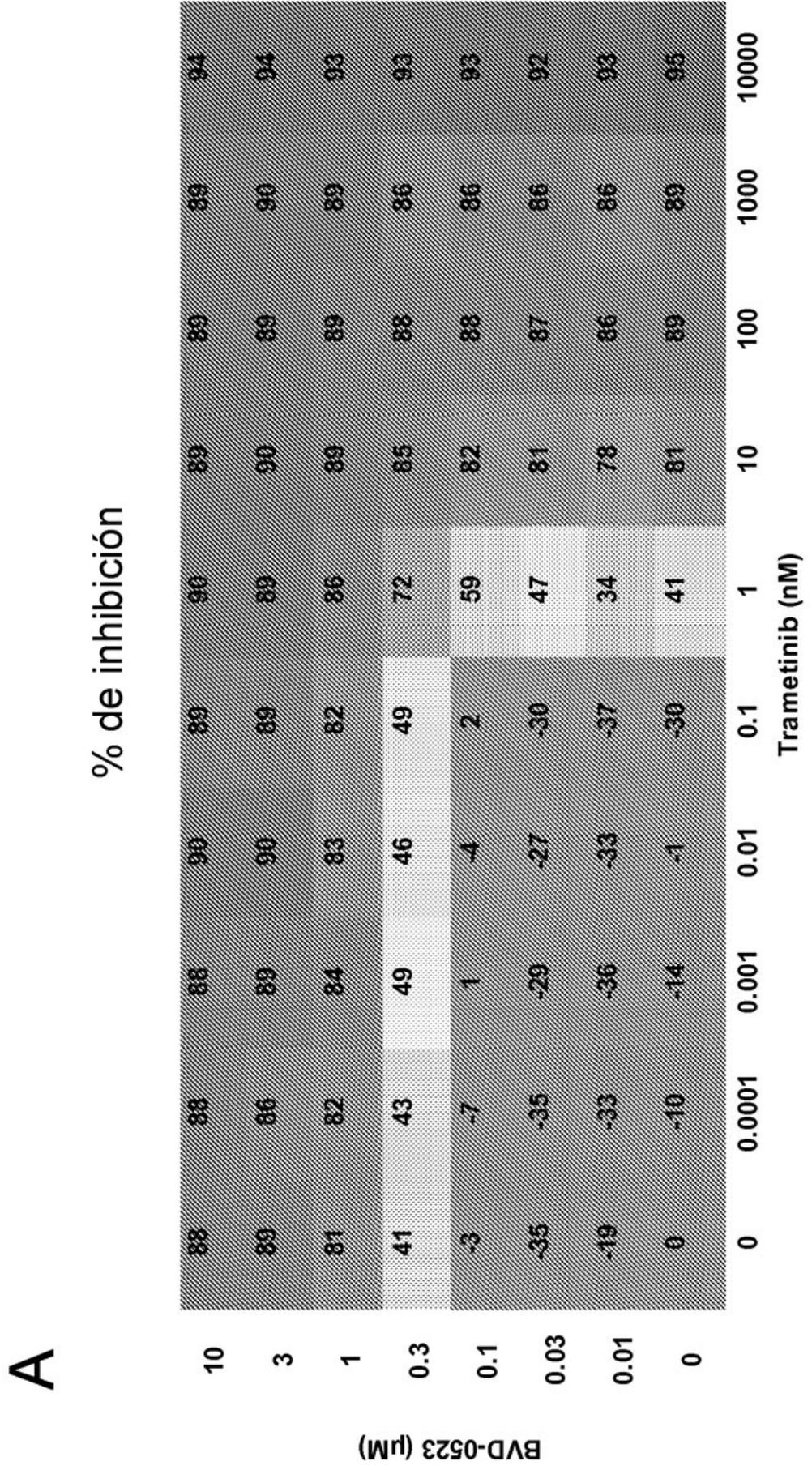
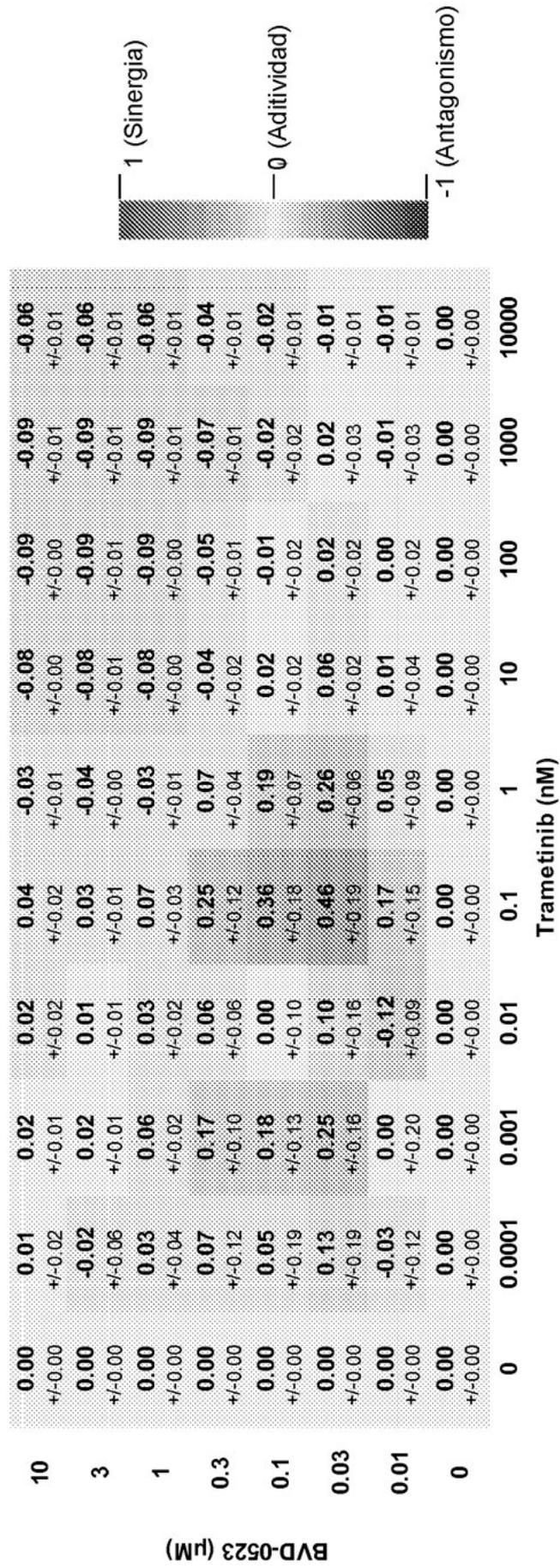


FIG. 14, Cont.

**B**

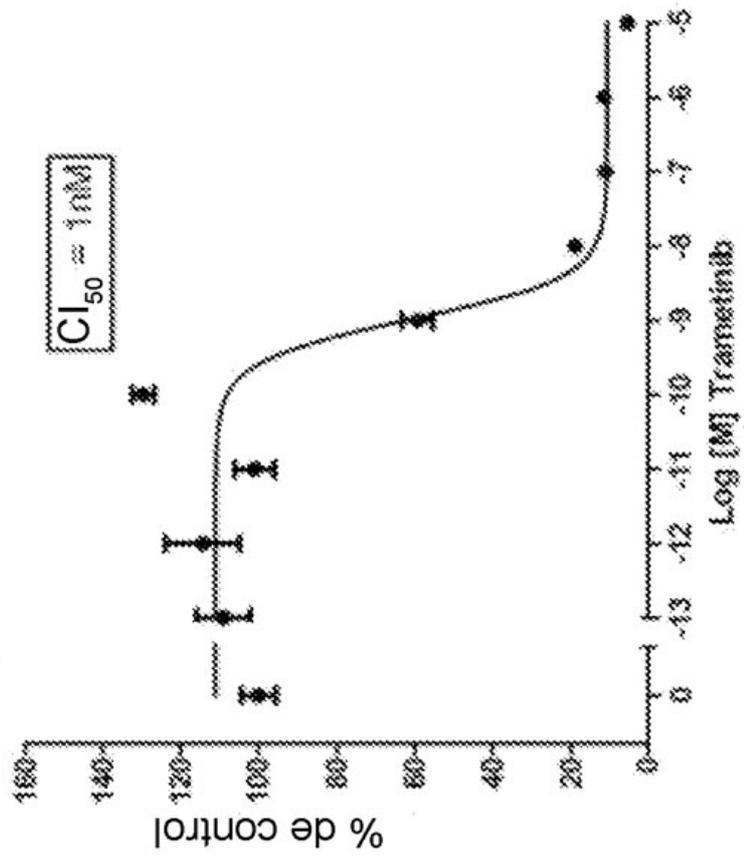
Exceso sobre Bliss:



# FIG. 14, Cont.

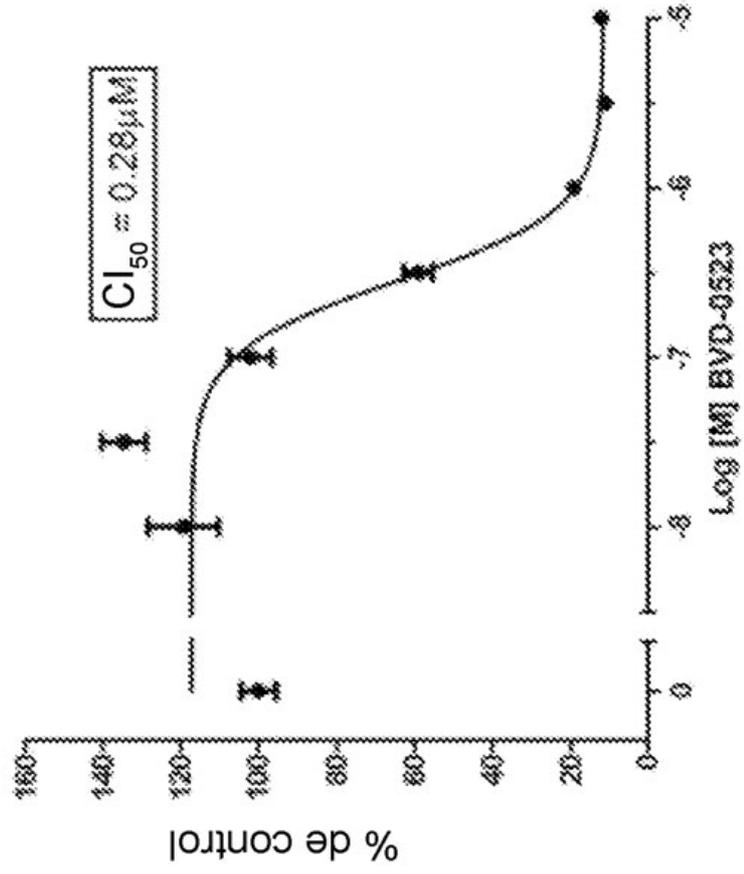
C

A375: Agente único de trametinib (Alamar Blue)



D

A375: Agente único de BVD-0523 (Alamar Blue)



# FIG. 14, Cont.

E

A375: Trametinib y BVD-0523 (Alamar Blue)

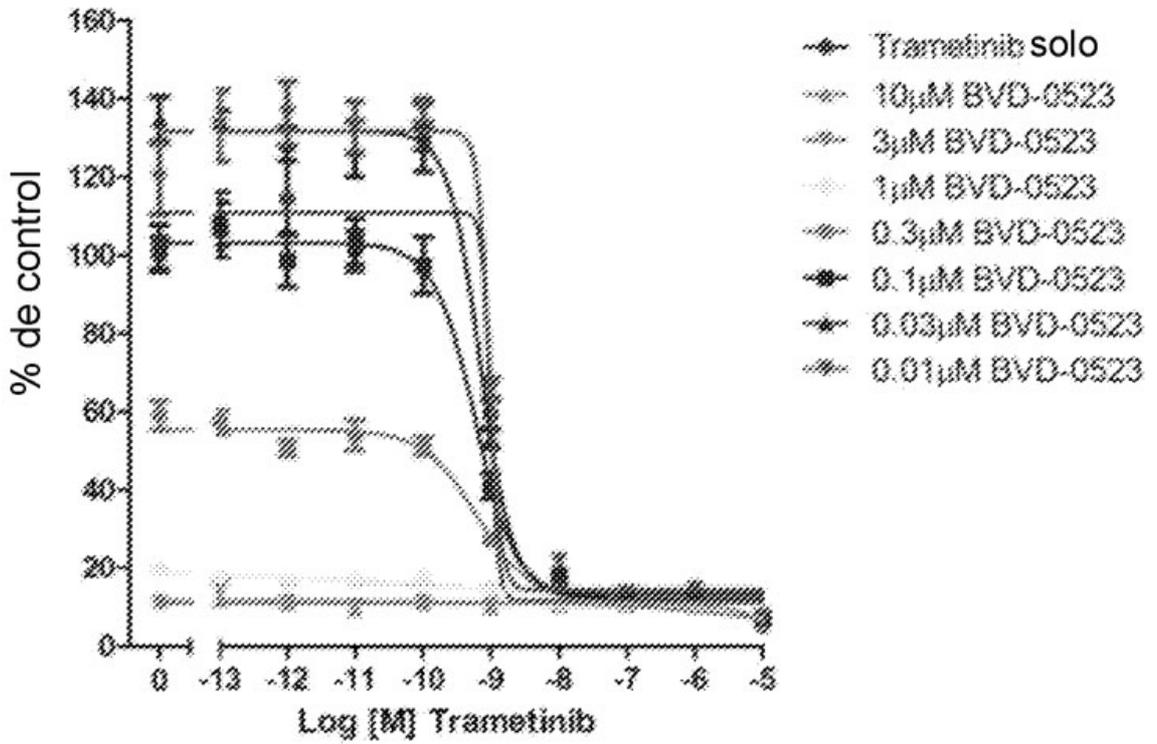


FIG. 15

A

% de inhibición:

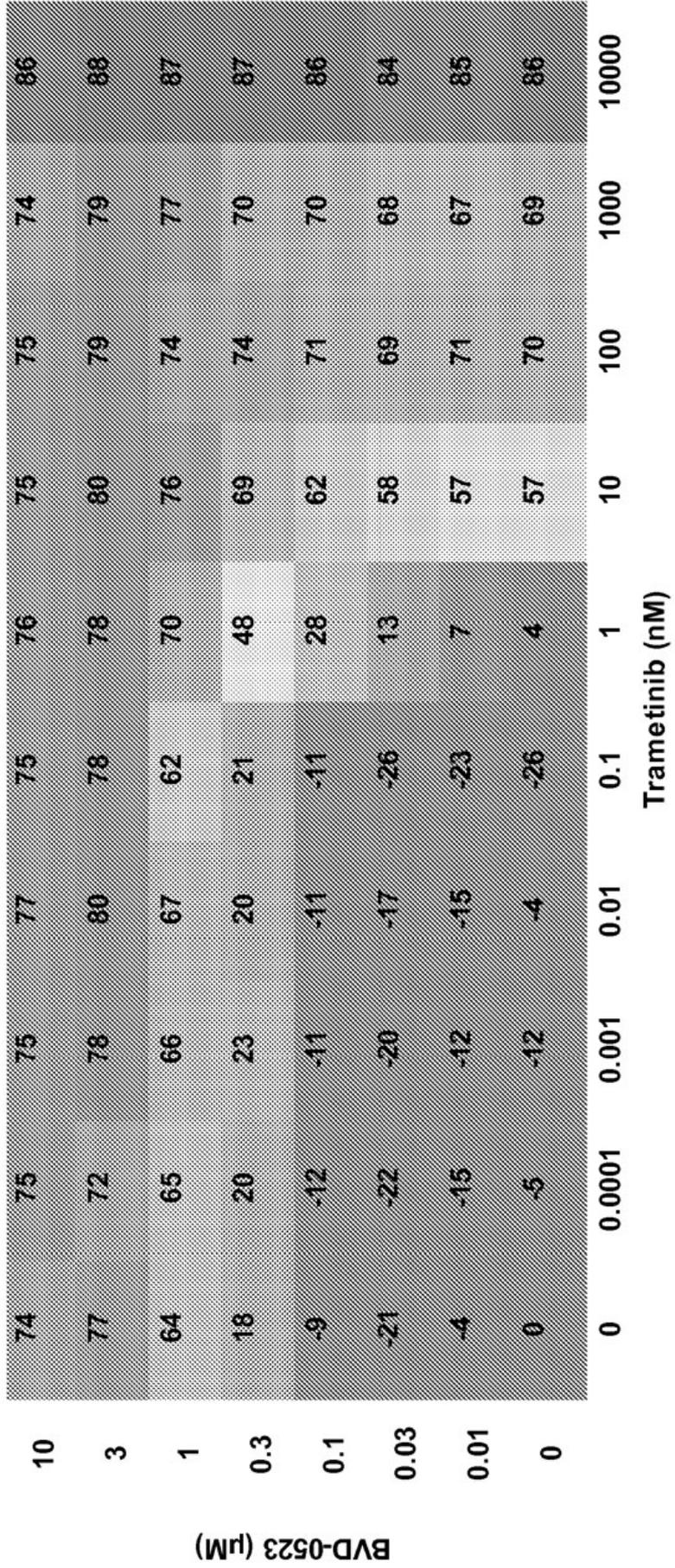
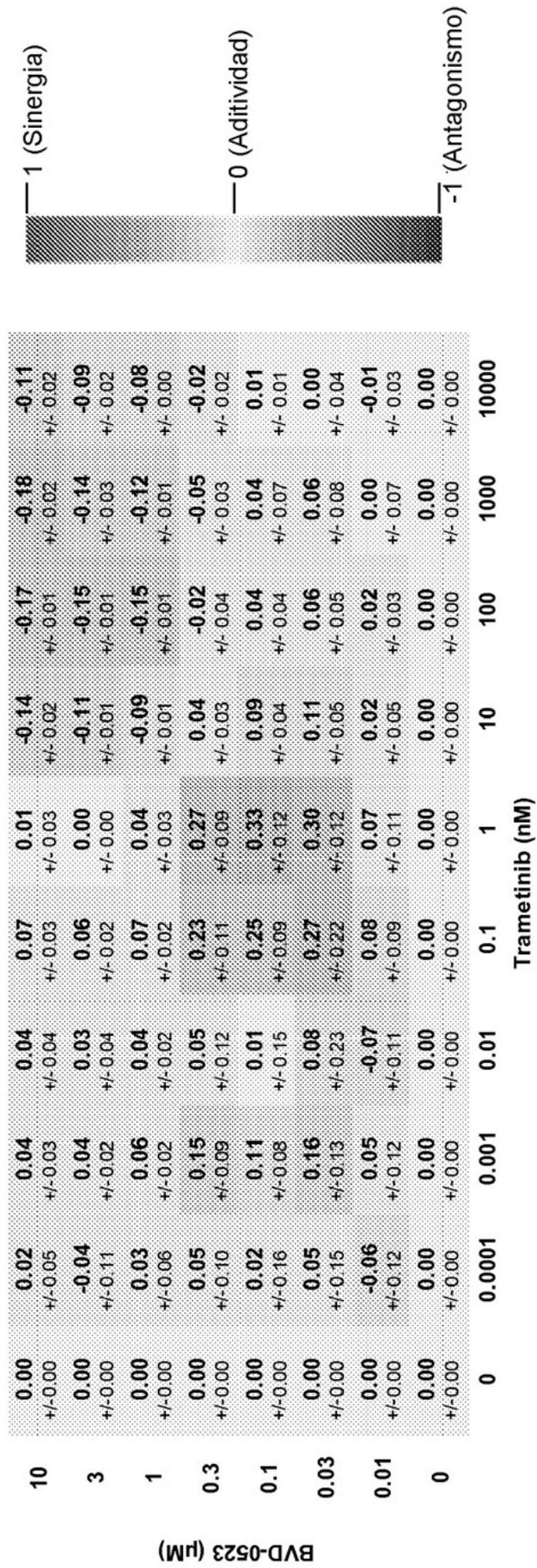


FIG. 15, Cont.

**B**

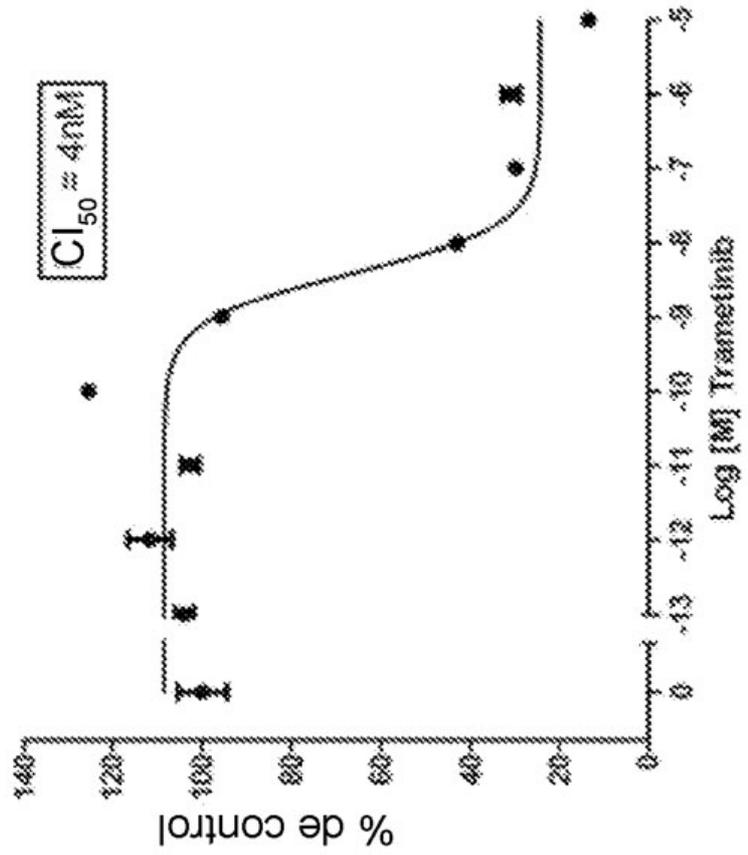
Exceso sobre Bliss:



# FIG. 15, Cont.

**C**

A375: Agente único de trametinib (CellTiter-Glo)



**D**

A375: Agente único de BVD-0523 (CellTiter-Glo)

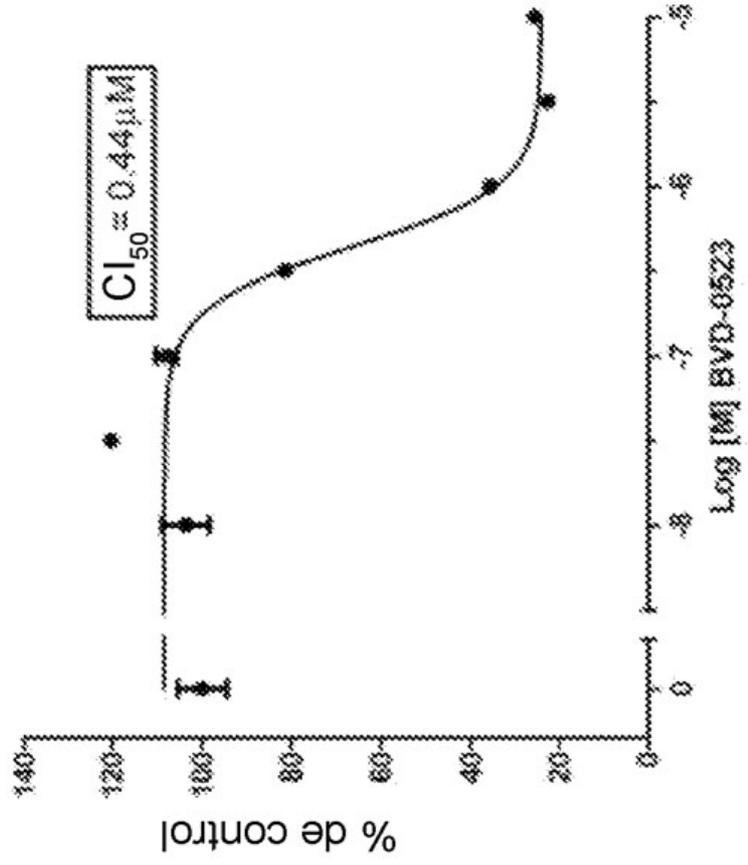


FIG. 15, Cont.

E

A375: Trametinib y BVD-0523 (CellTiter-Glo)

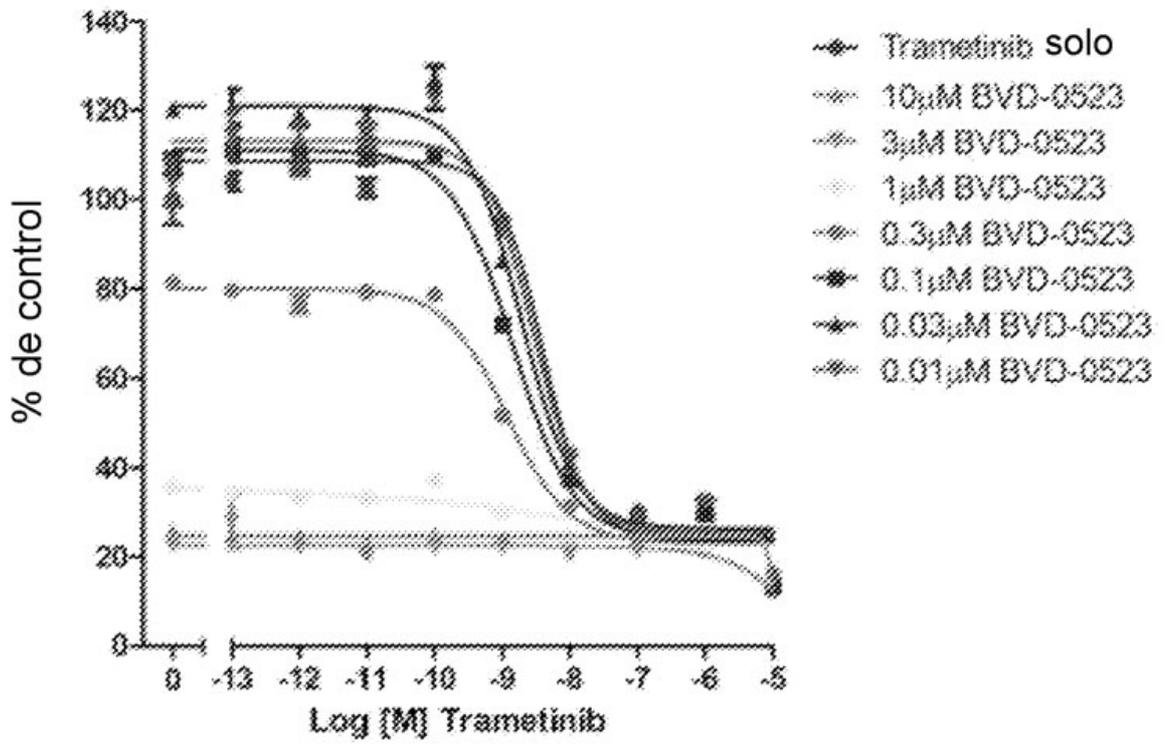






FIG. 17

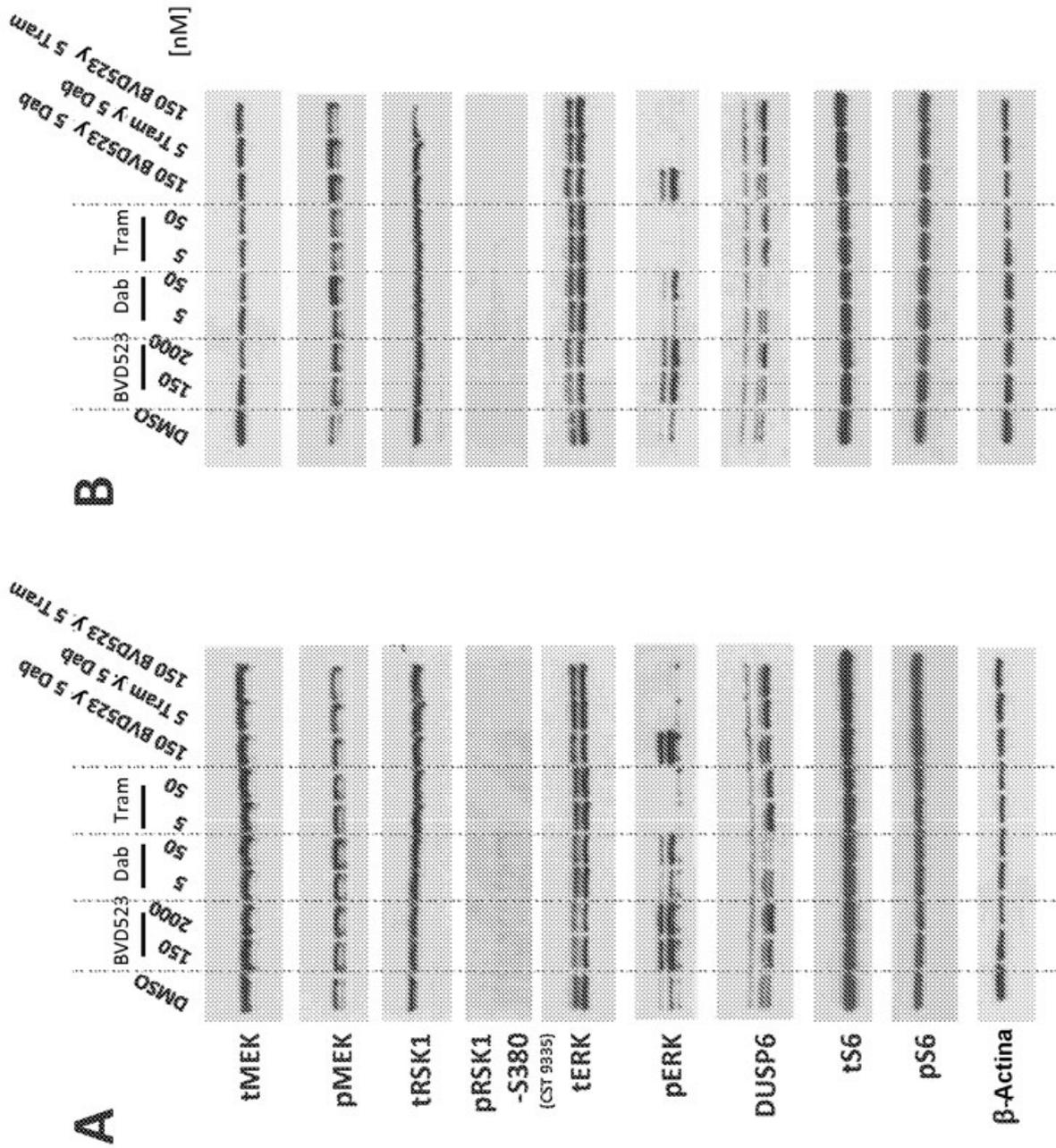


FIG. 17, Cont.

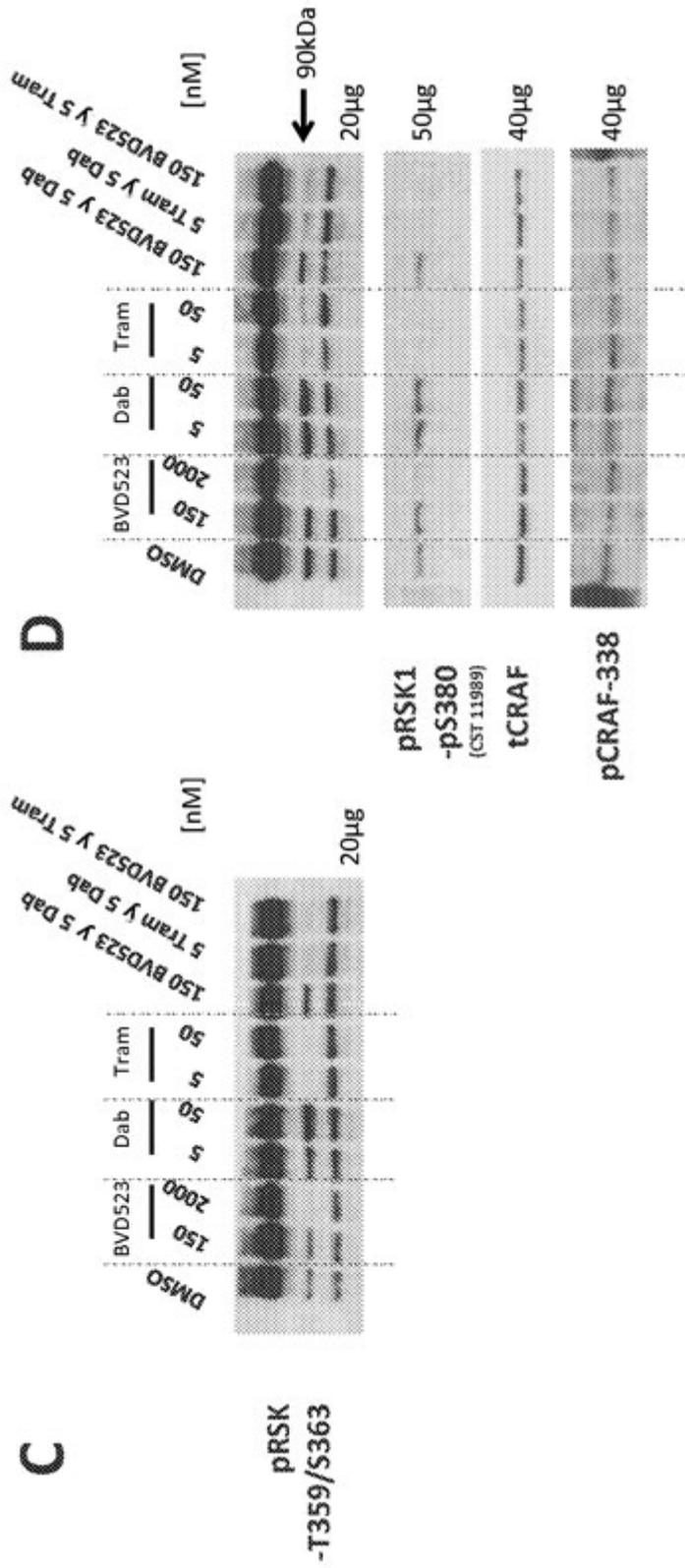


FIG. 18

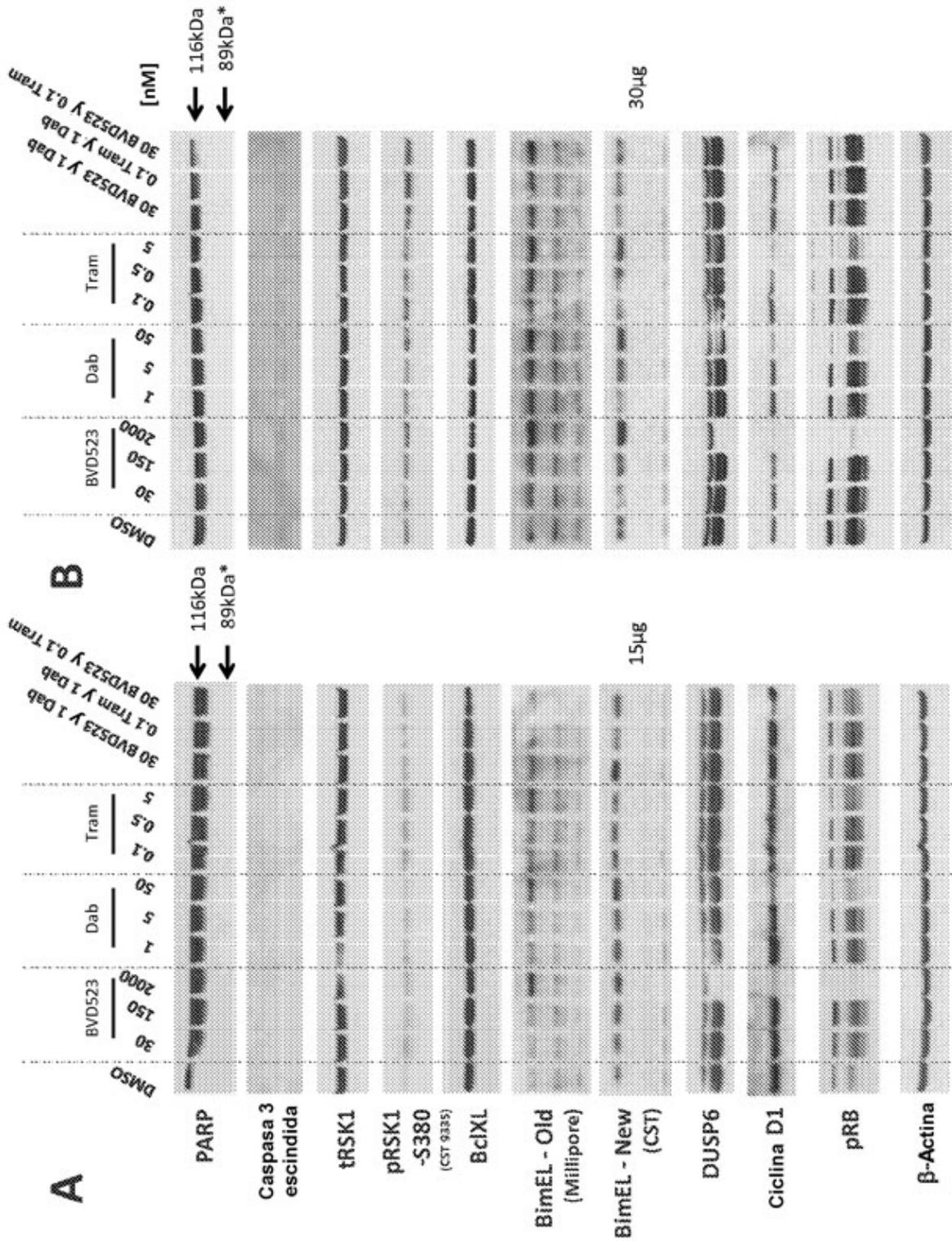


FIG. 18, Cont.

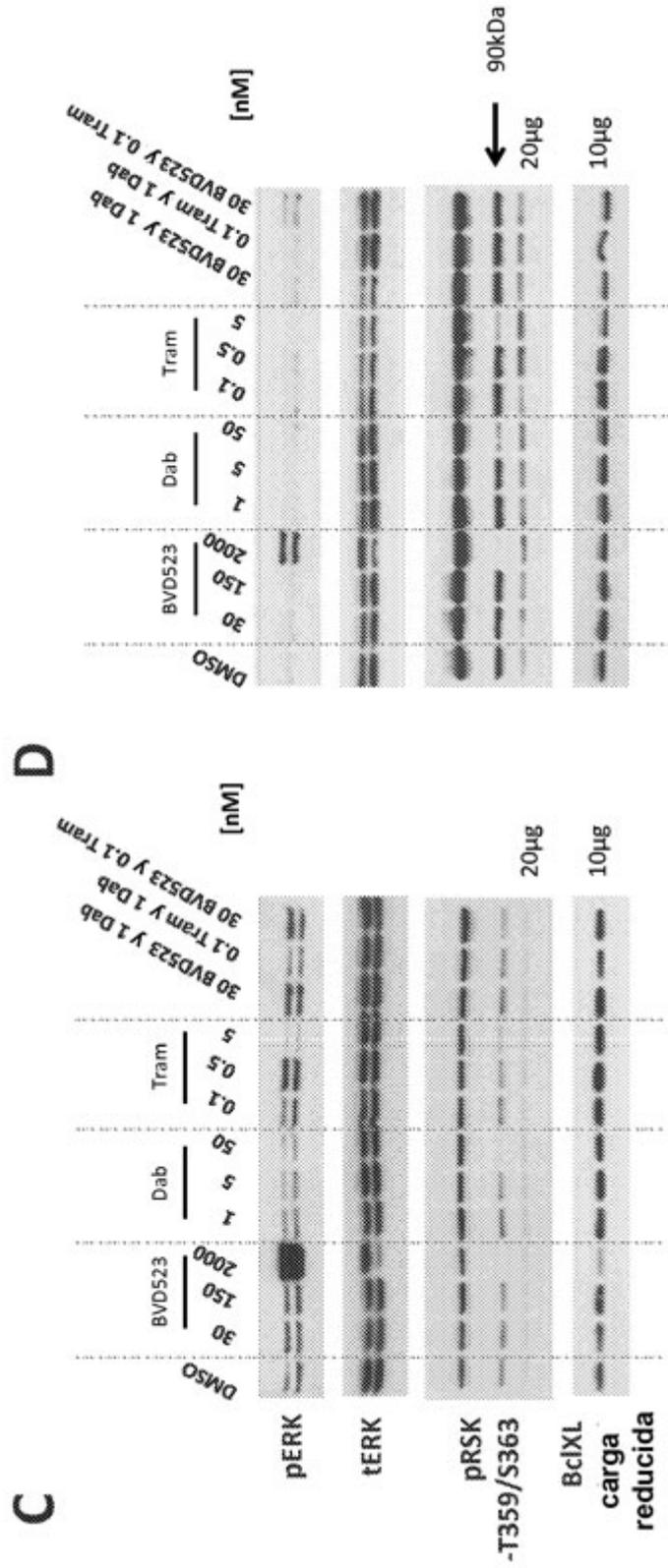


FIG. 19

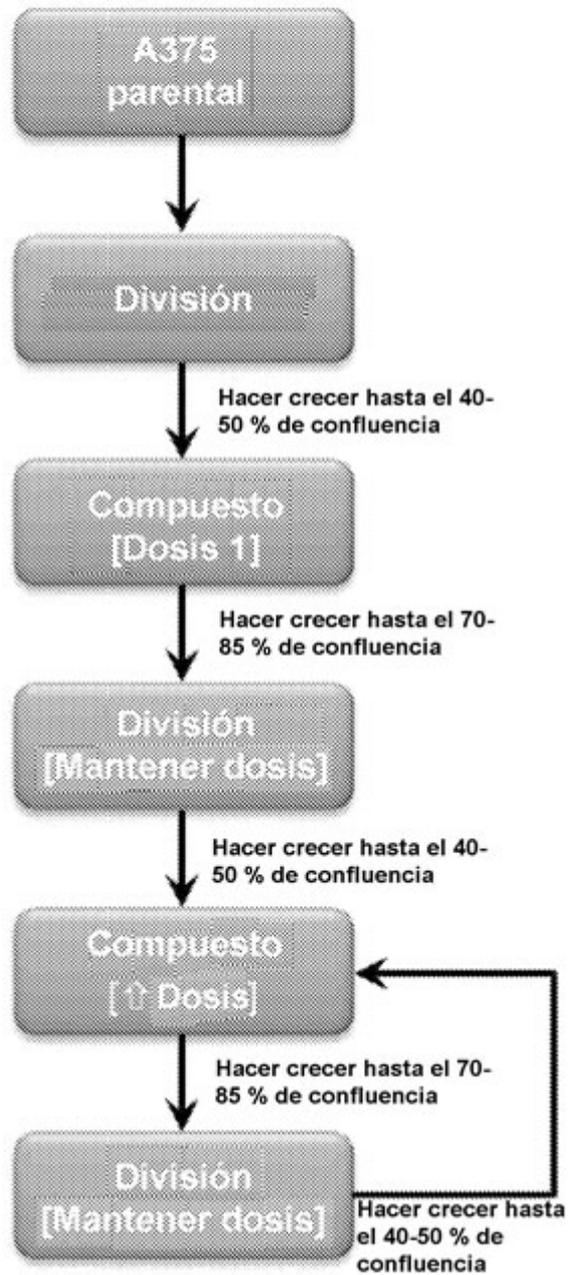


FIG. 20

◆ A375 Parental  
 ■ A375 NRAS (Q61K/+)

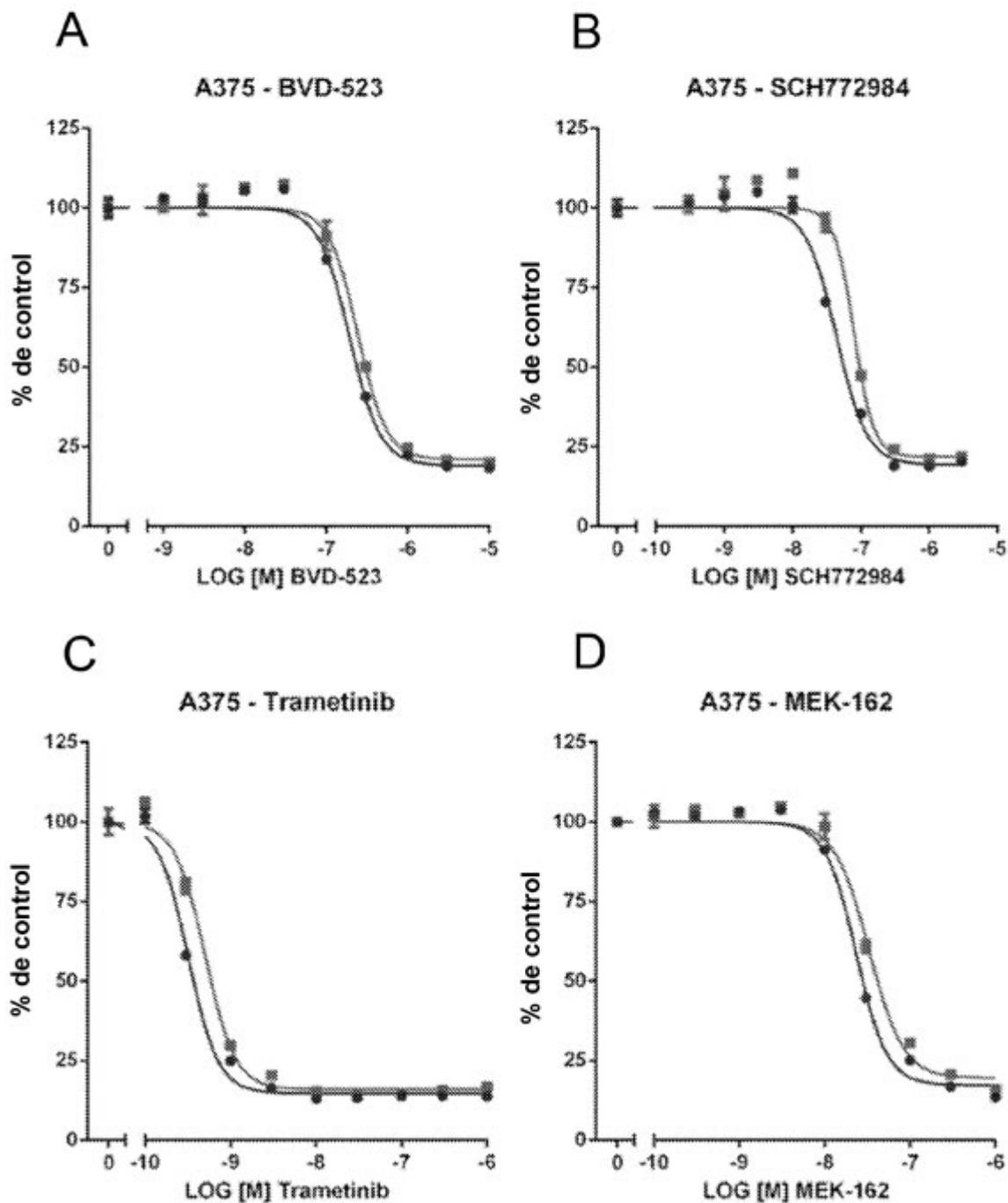


FIG. 20, Cont.

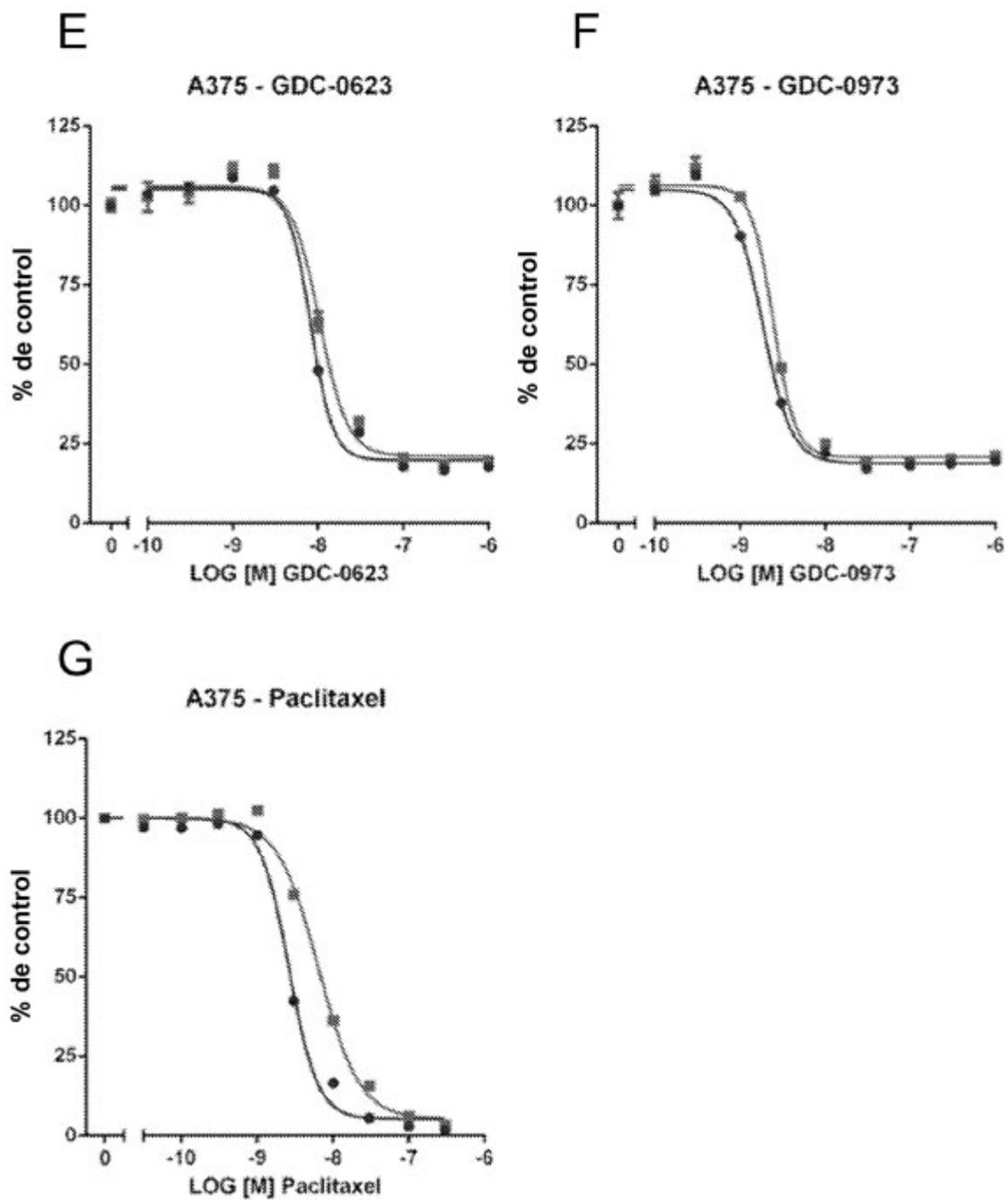


FIG. 21

HCT116 Parental  
 HCT116 KRAS KO (+/-)

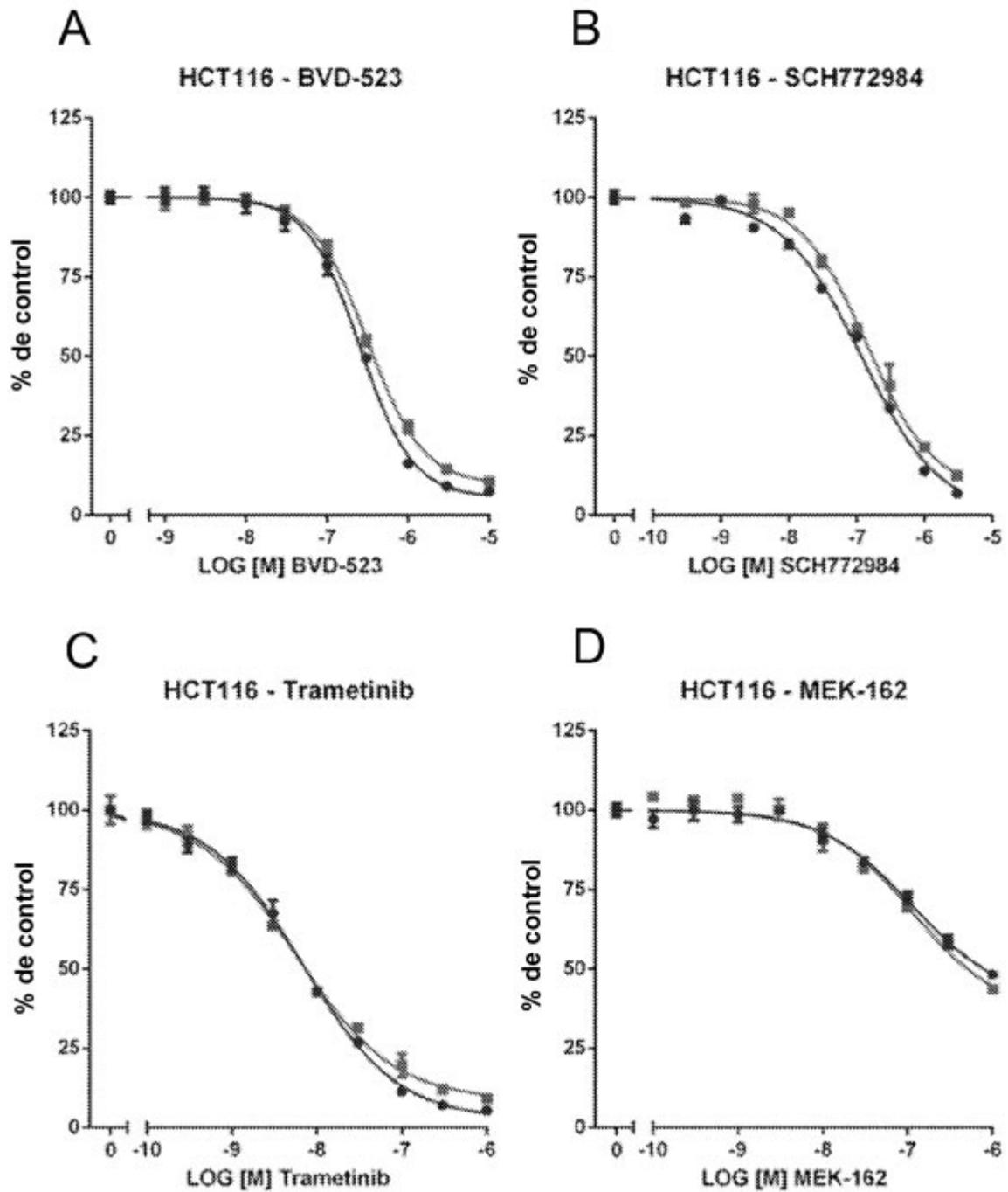


FIG. 21, Cont.

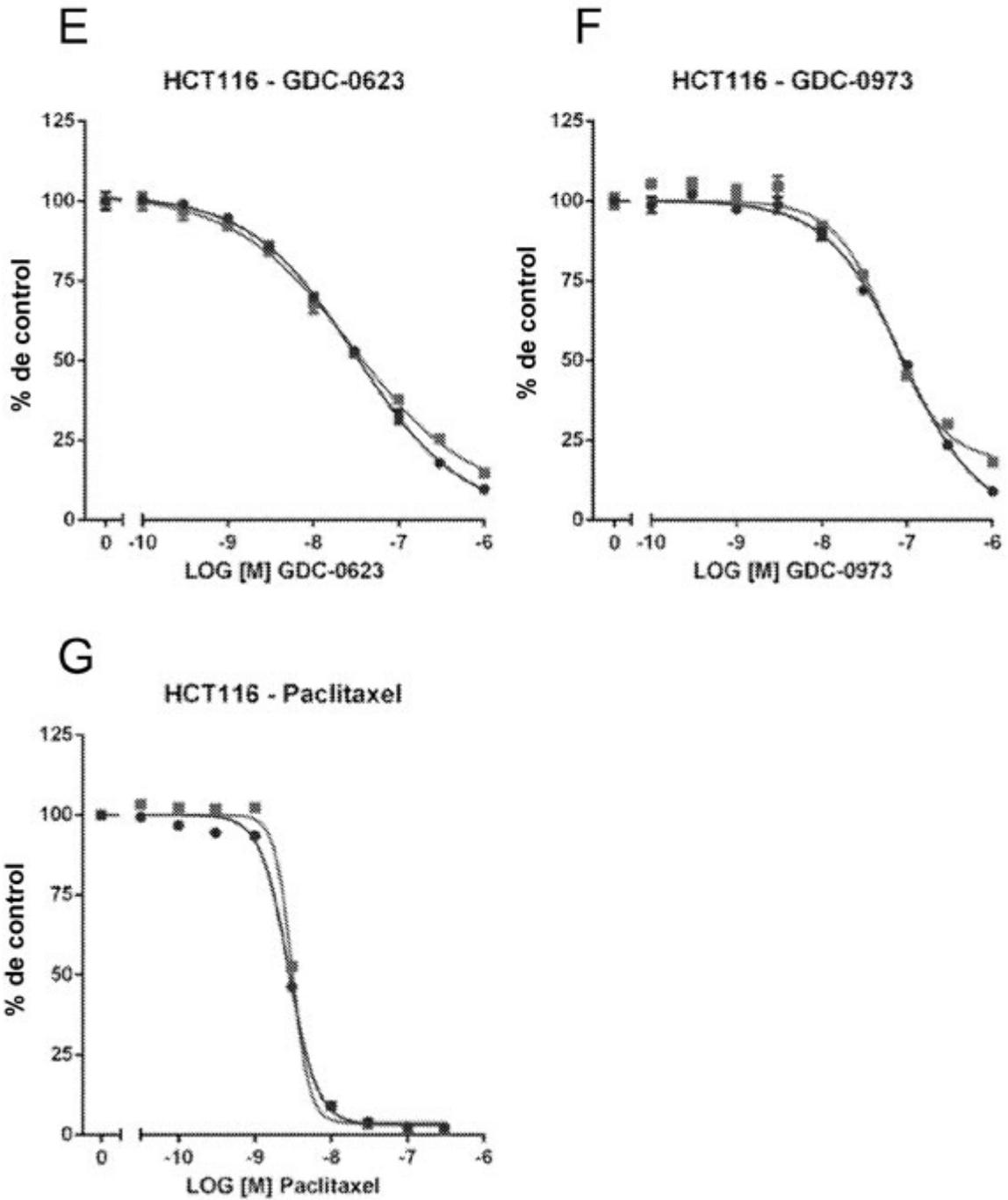


FIG. 22

RKO Parental  
 RKO BRAF V600E KO (+/-)

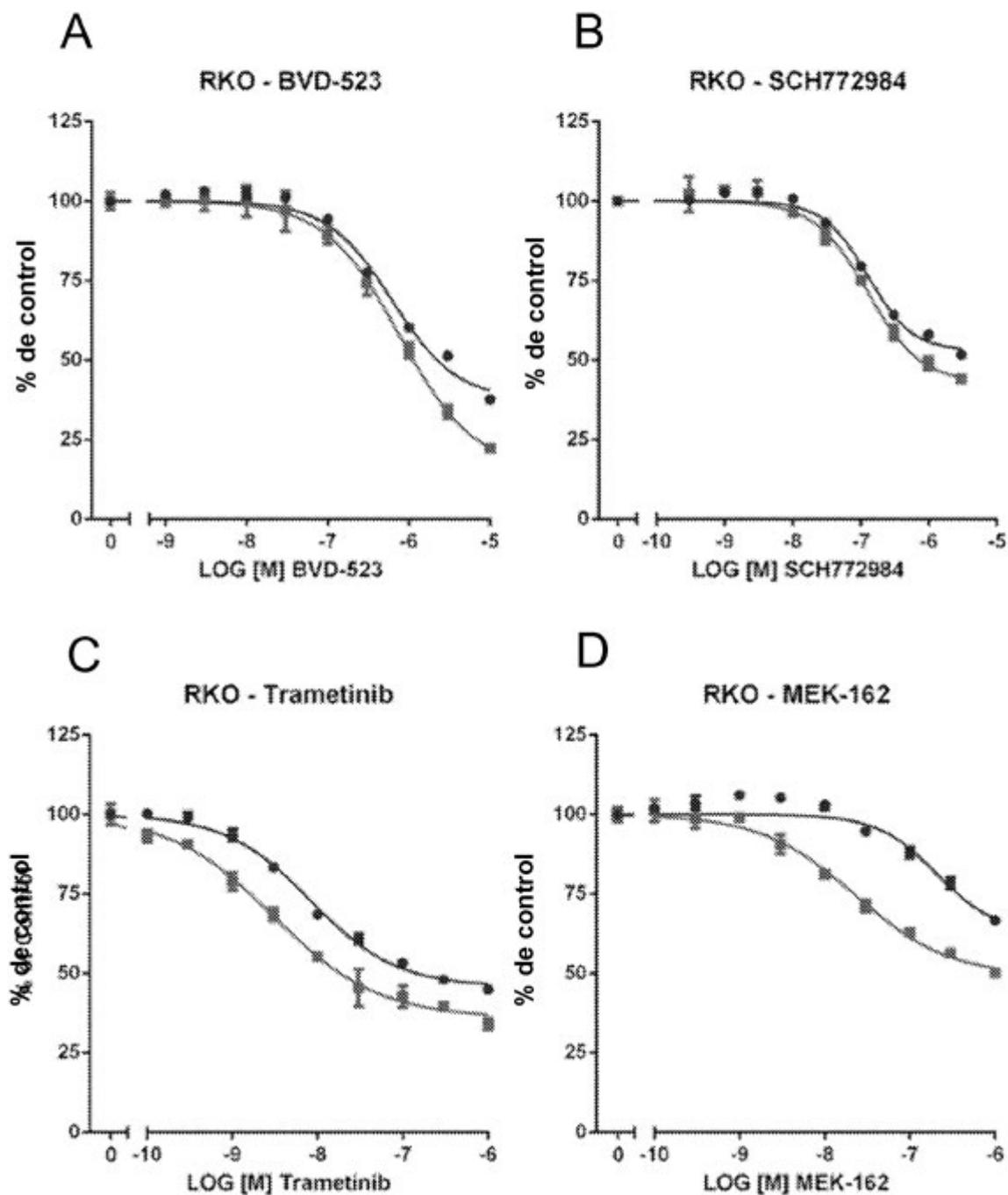


FIG. 22, Cont.

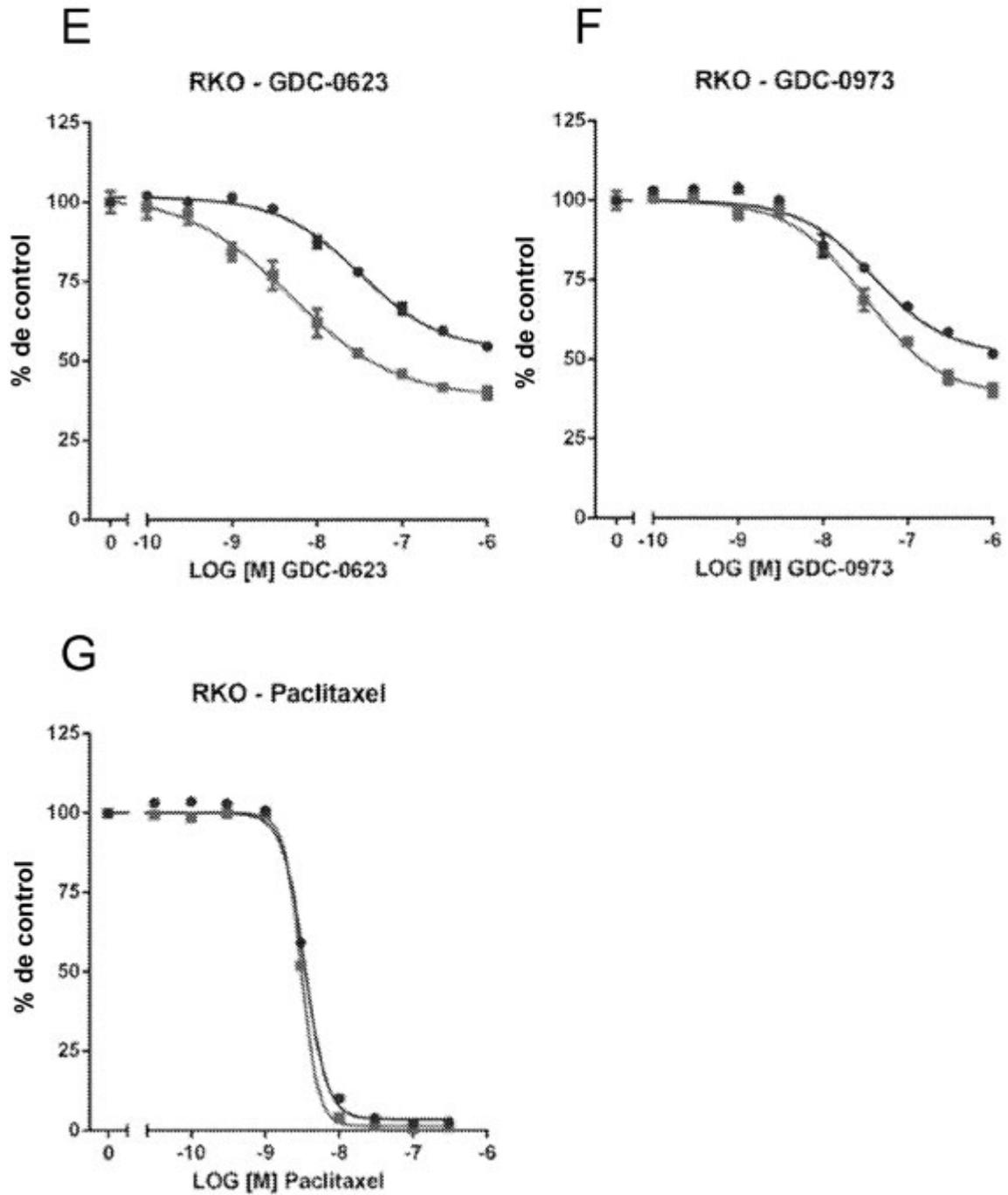


FIG. 23

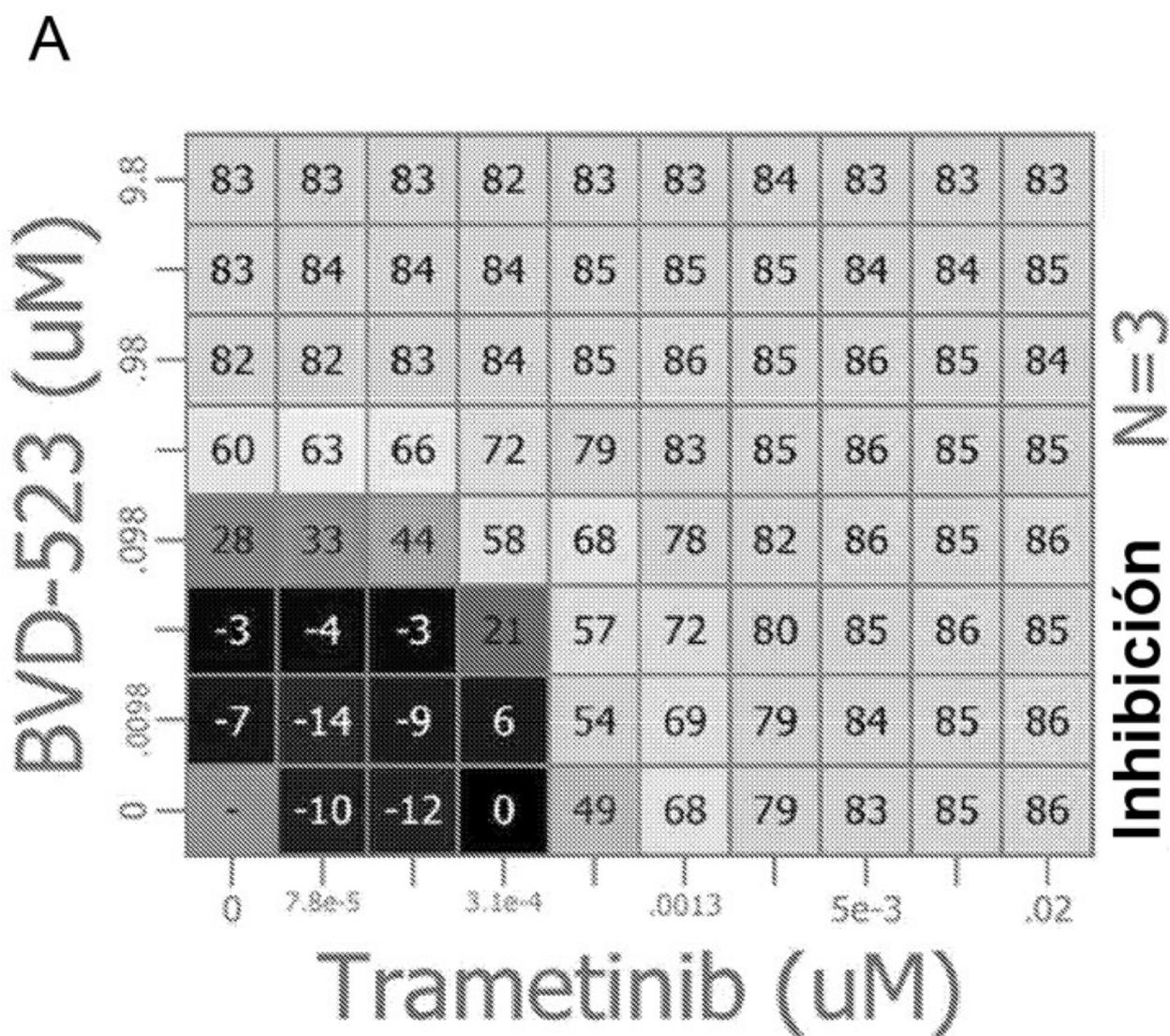
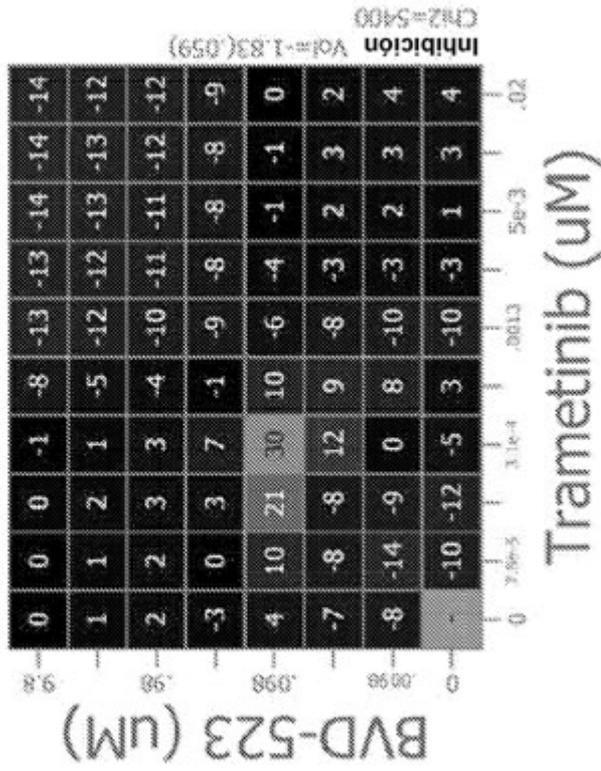


FIG. 23, Cont.

C



B

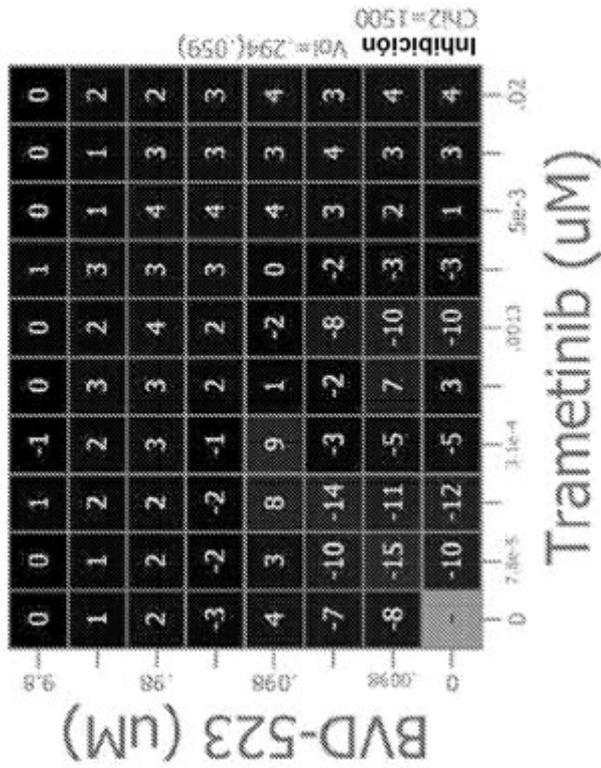


FIG. 23, Cont.

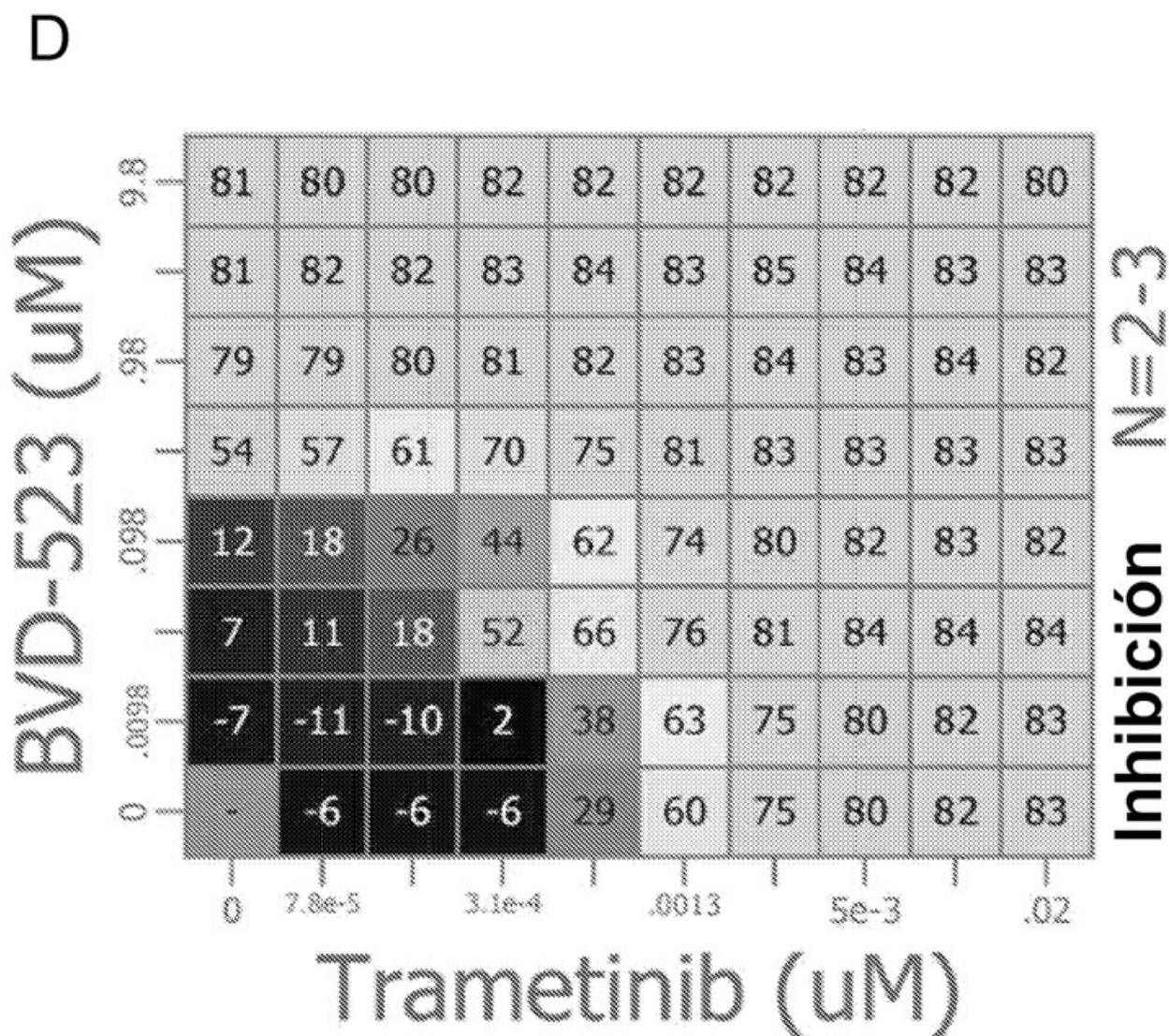


FIG. 23, Cont.

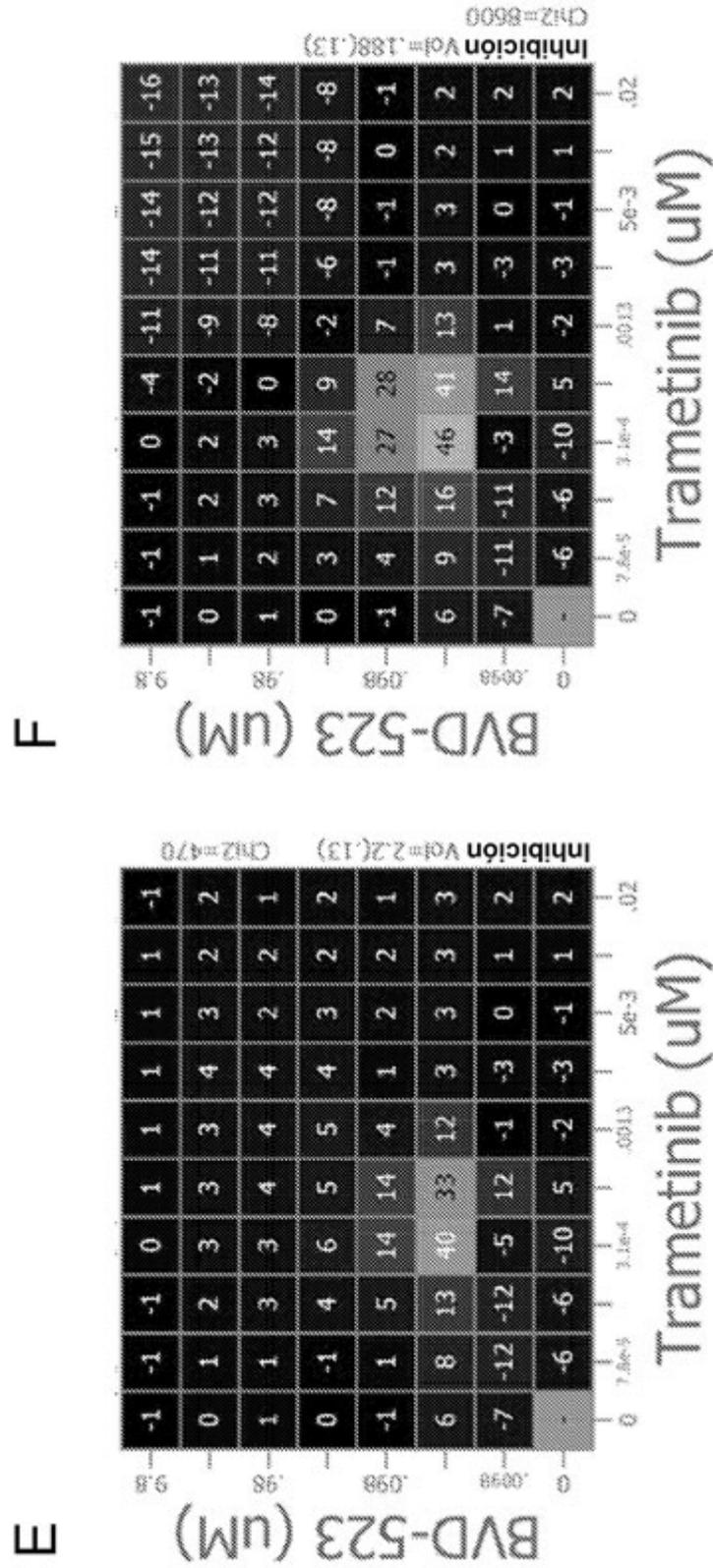


FIG. 23, Cont.

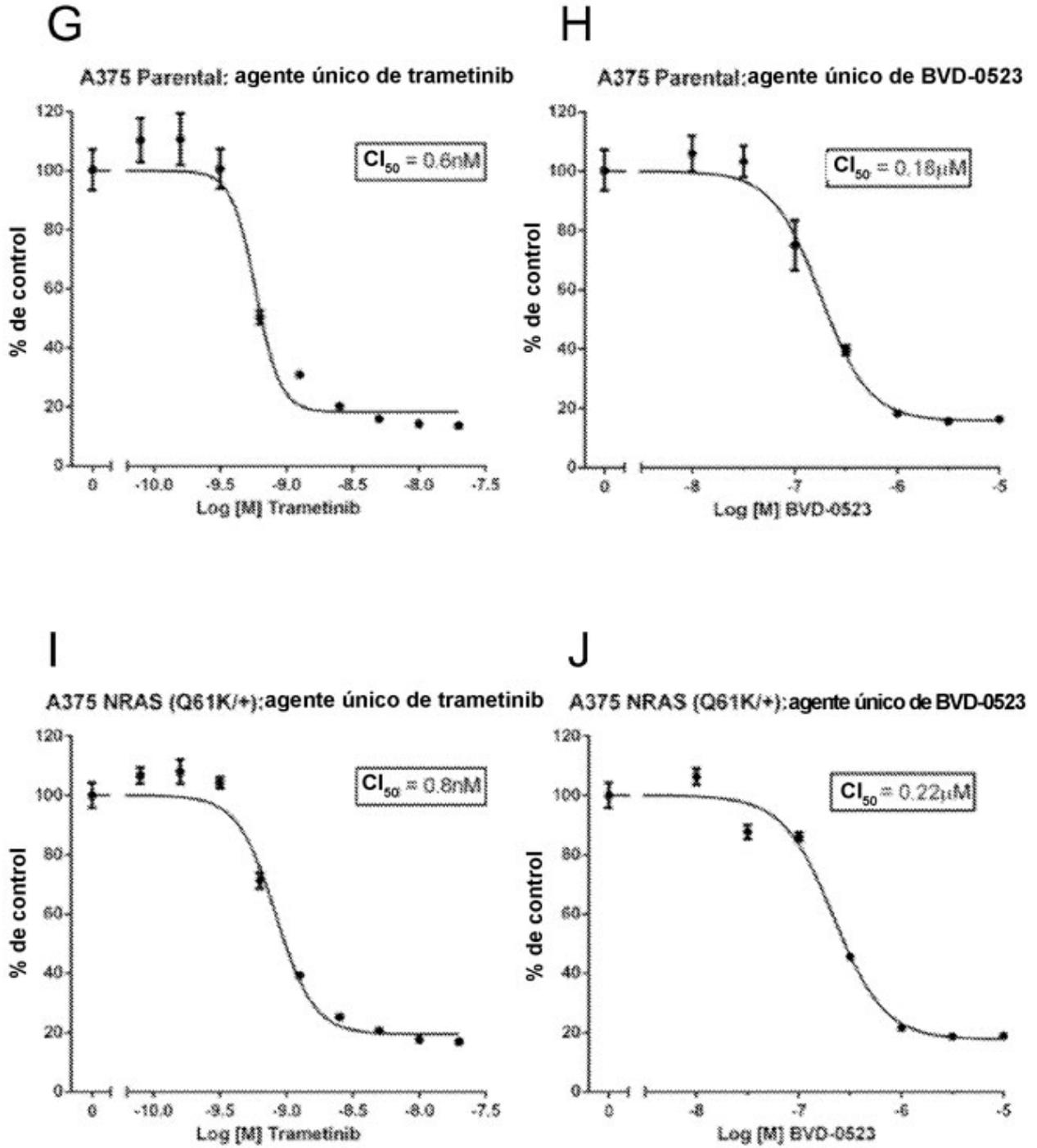


FIG. 24

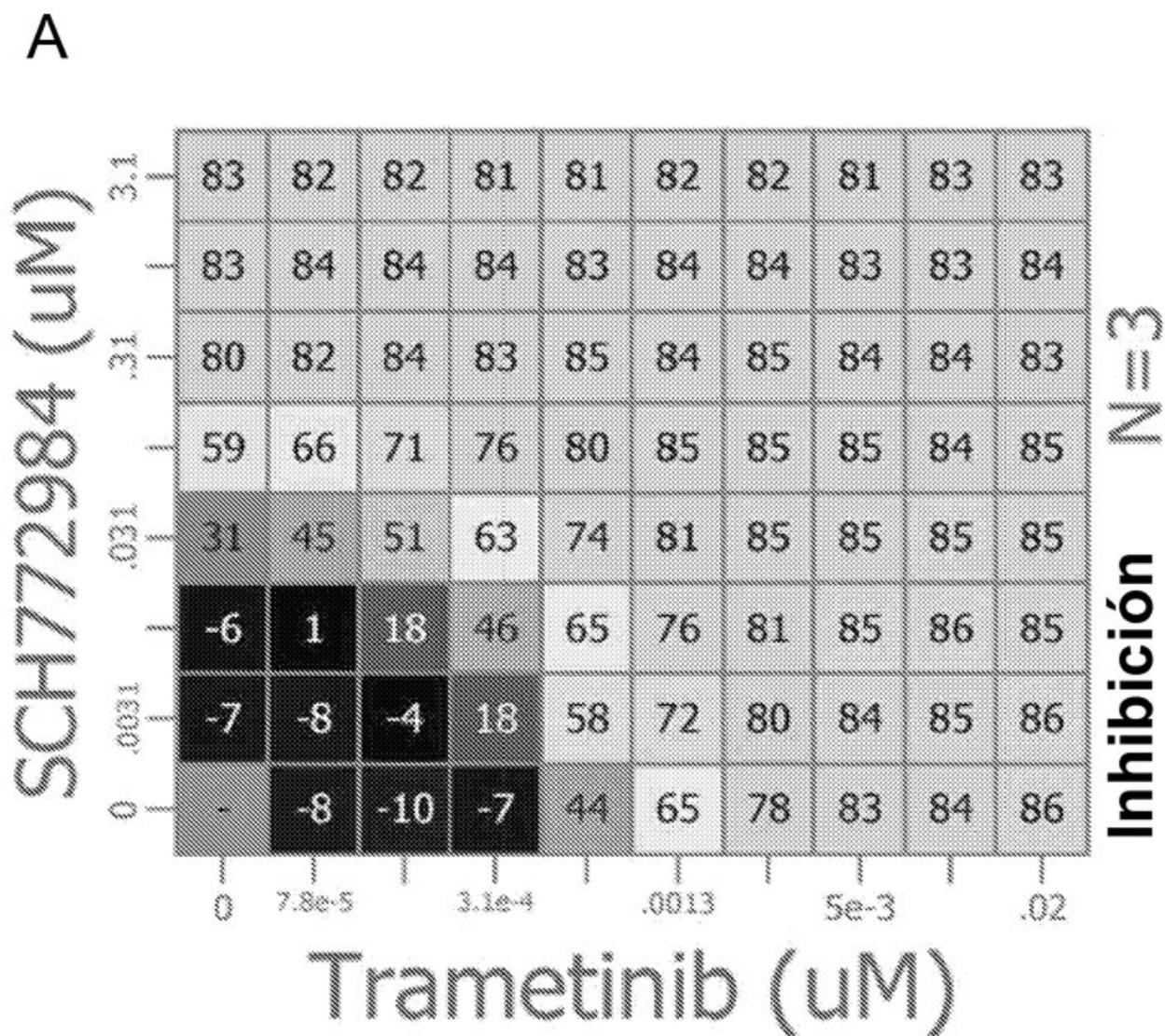
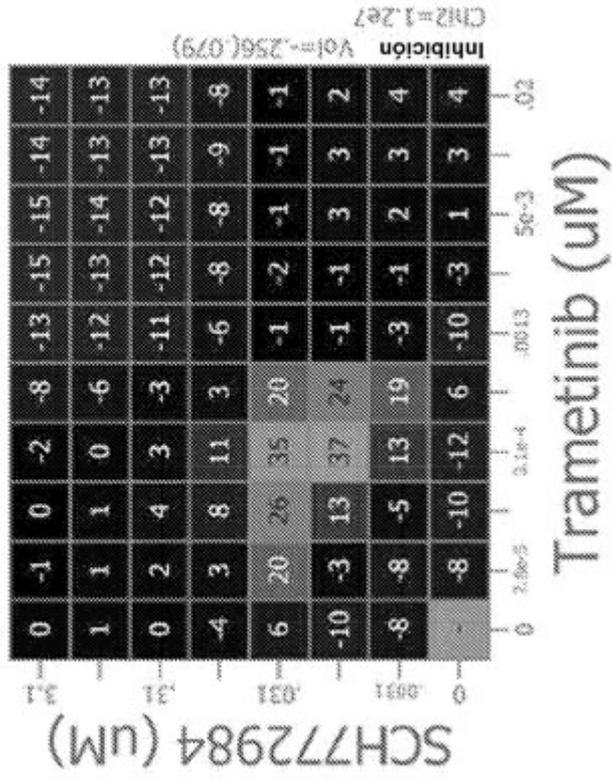


FIG. 24, Cont.

C



B

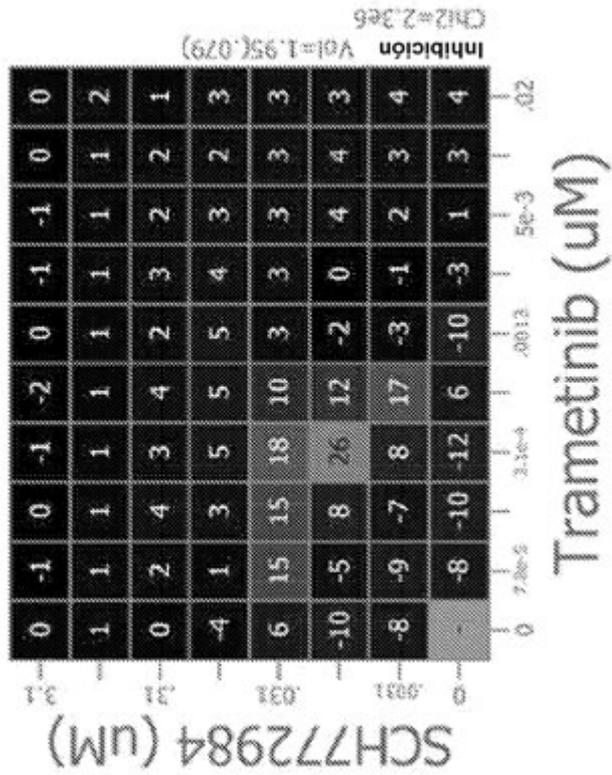


FIG. 24, Cont.

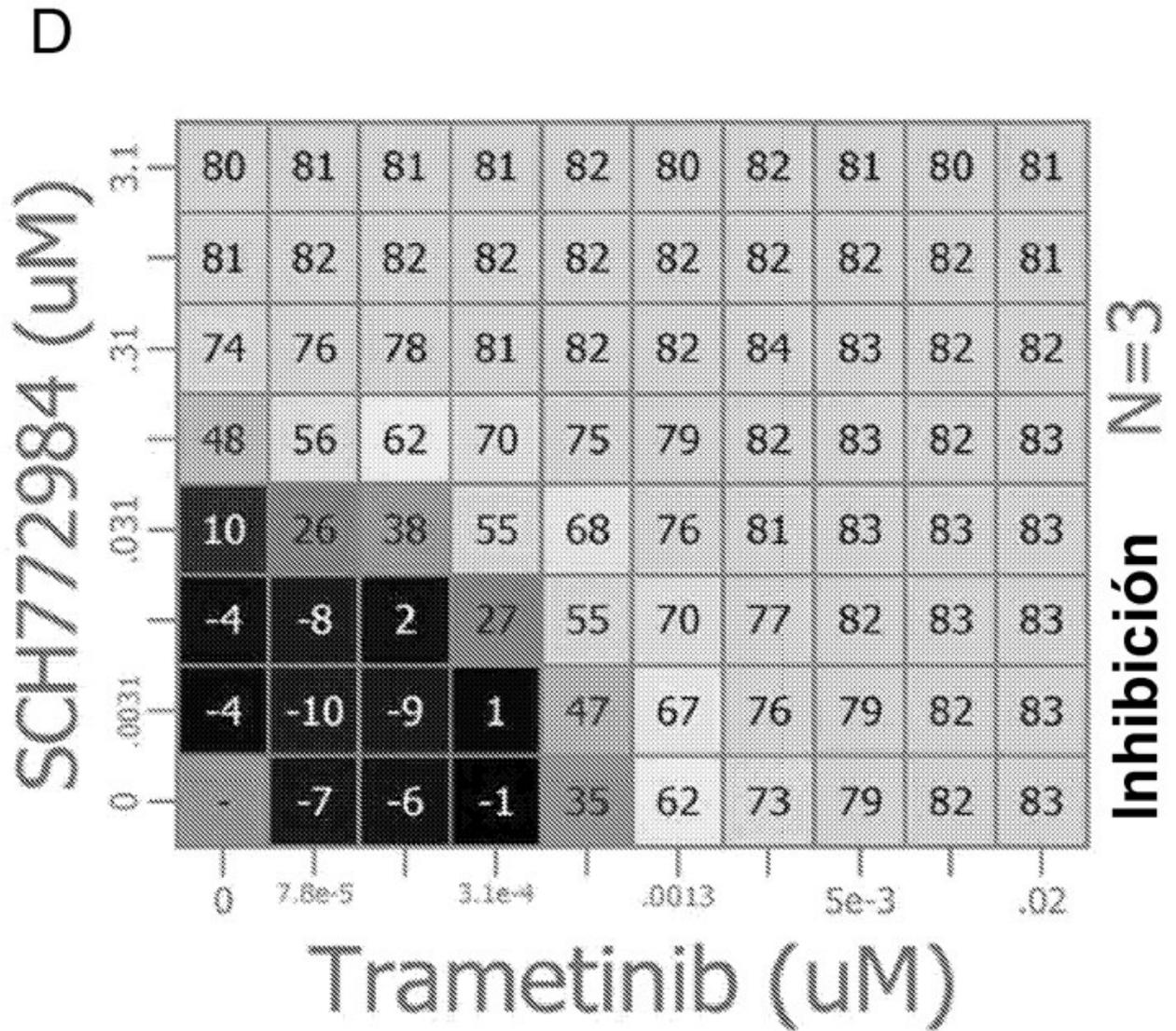
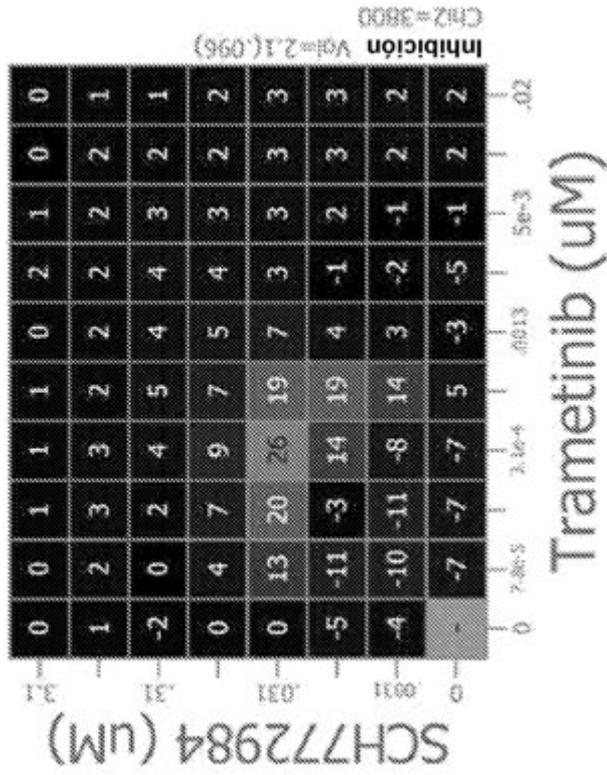


FIG. 24, Cont.

E



F

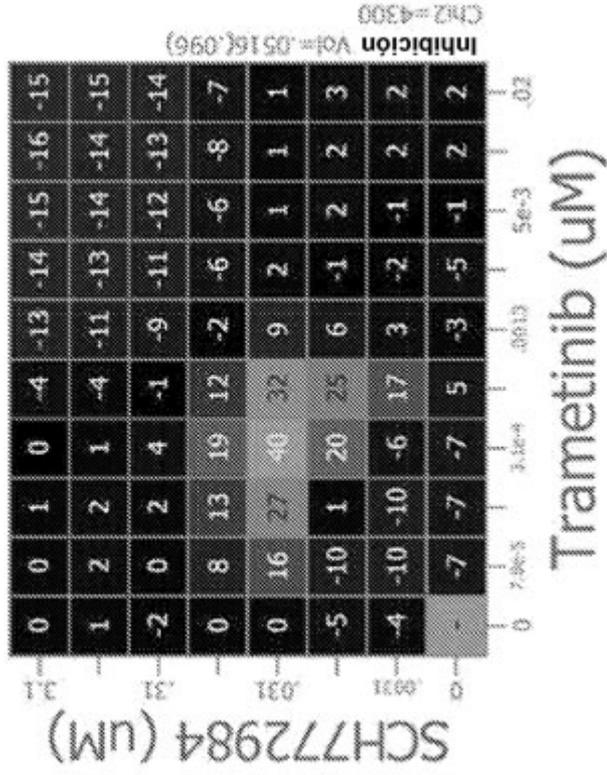


FIG. 24, Cont.

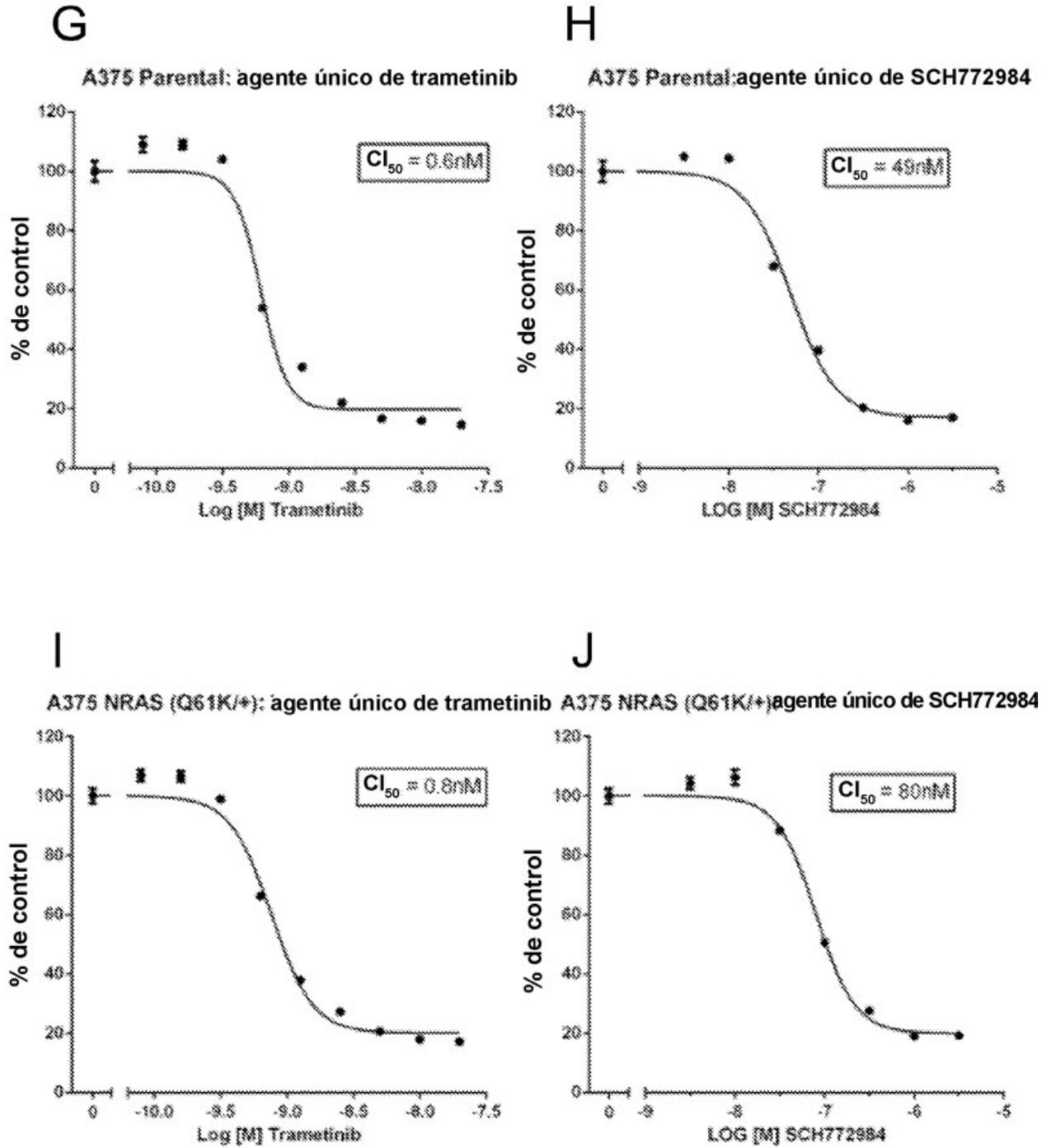


FIG. 25

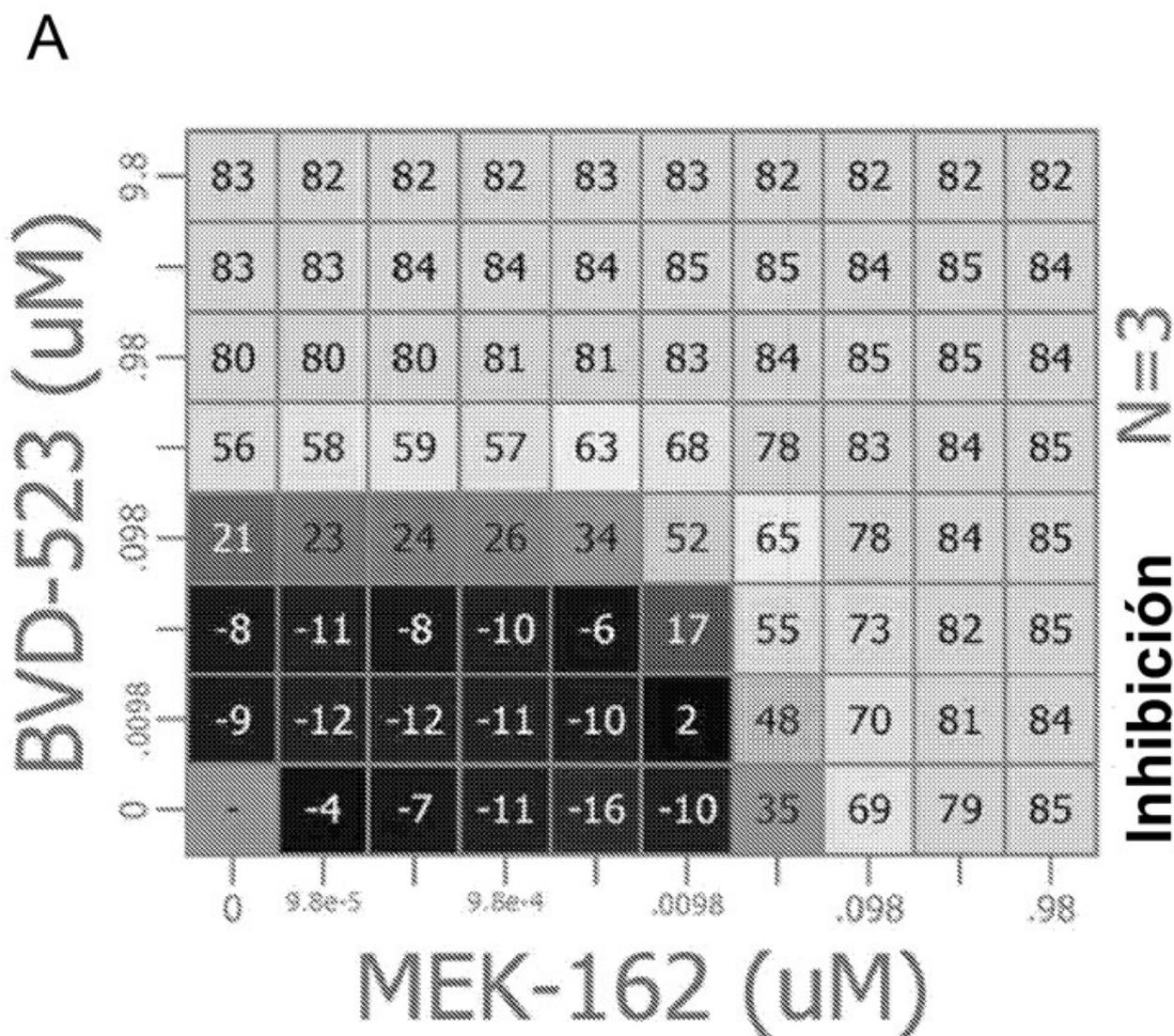


FIG. 25, Cont.

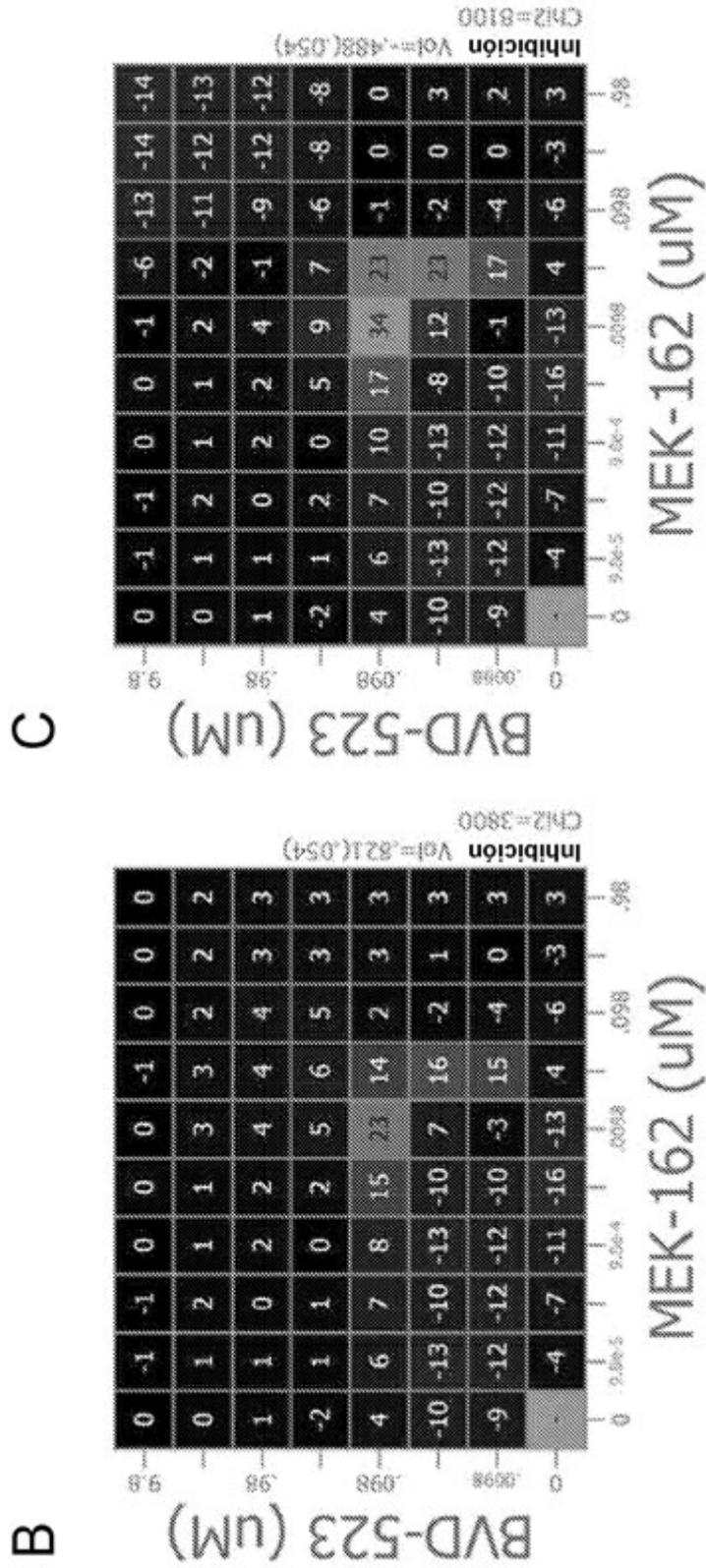


FIG. 25, Cont.

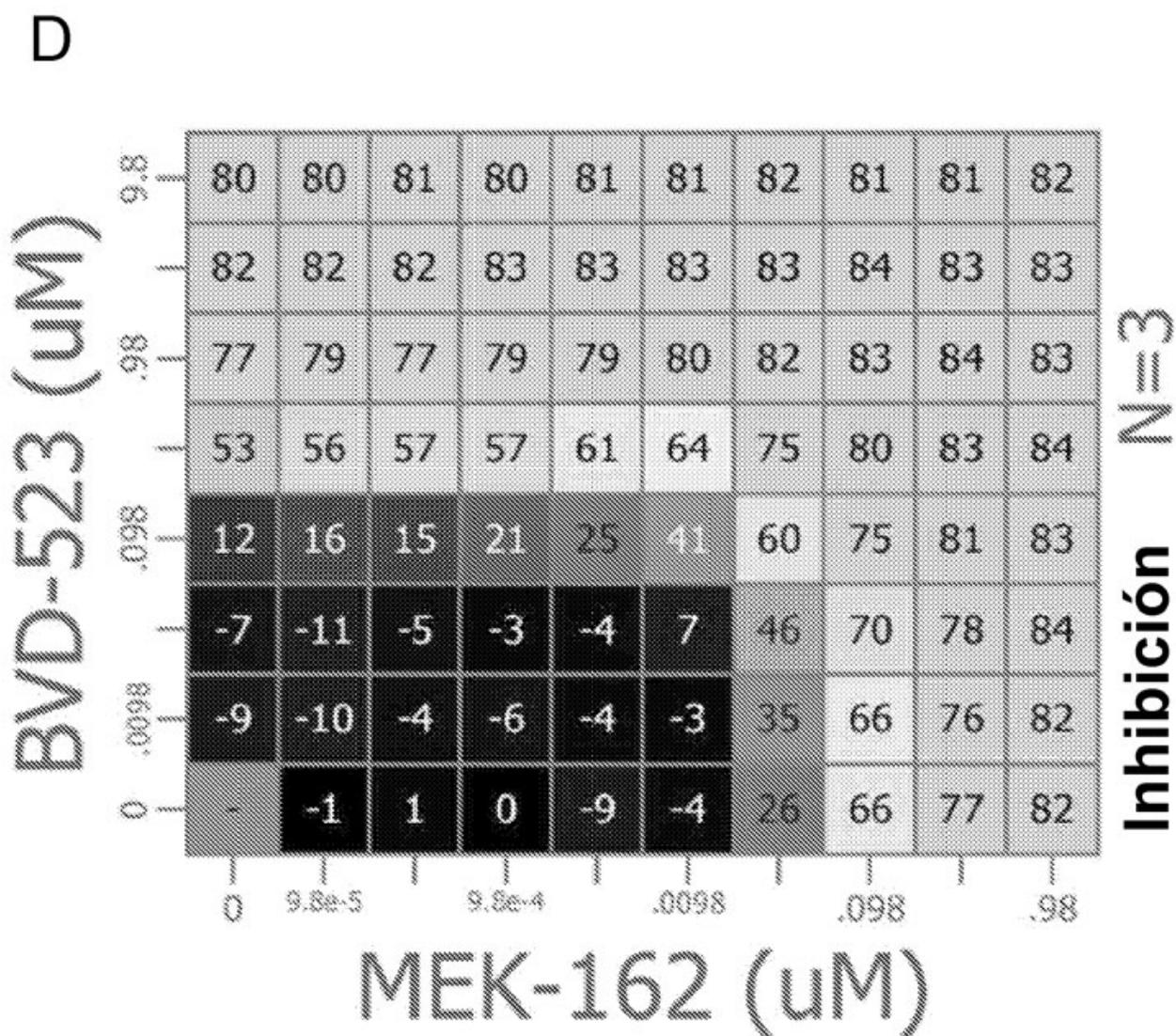
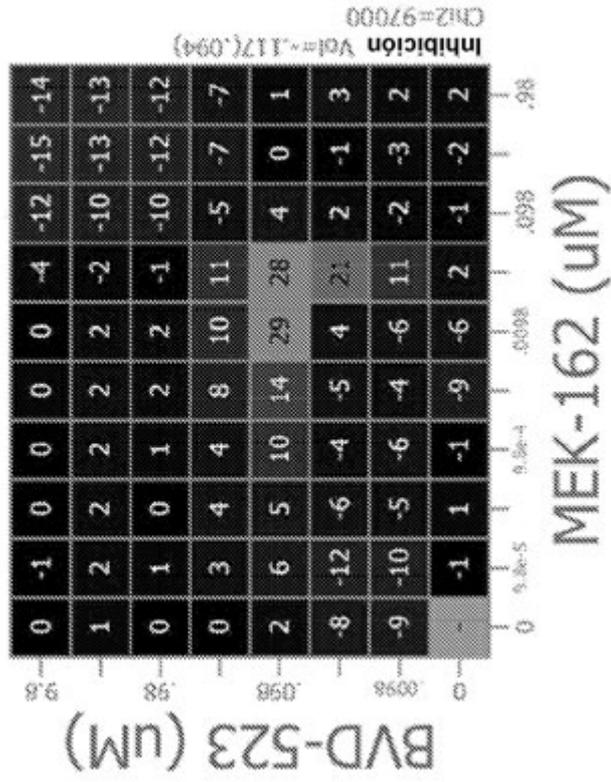


FIG. 25, Cont.

F



E

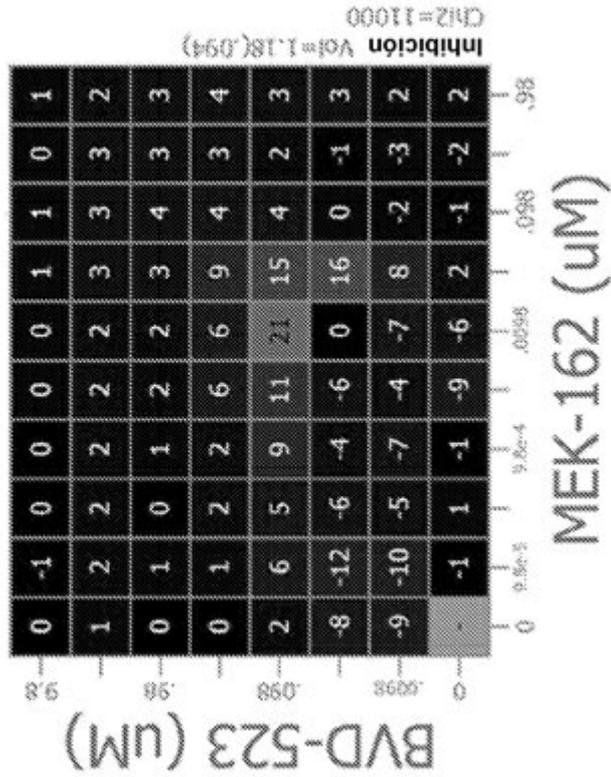


FIG. 25, Cont.

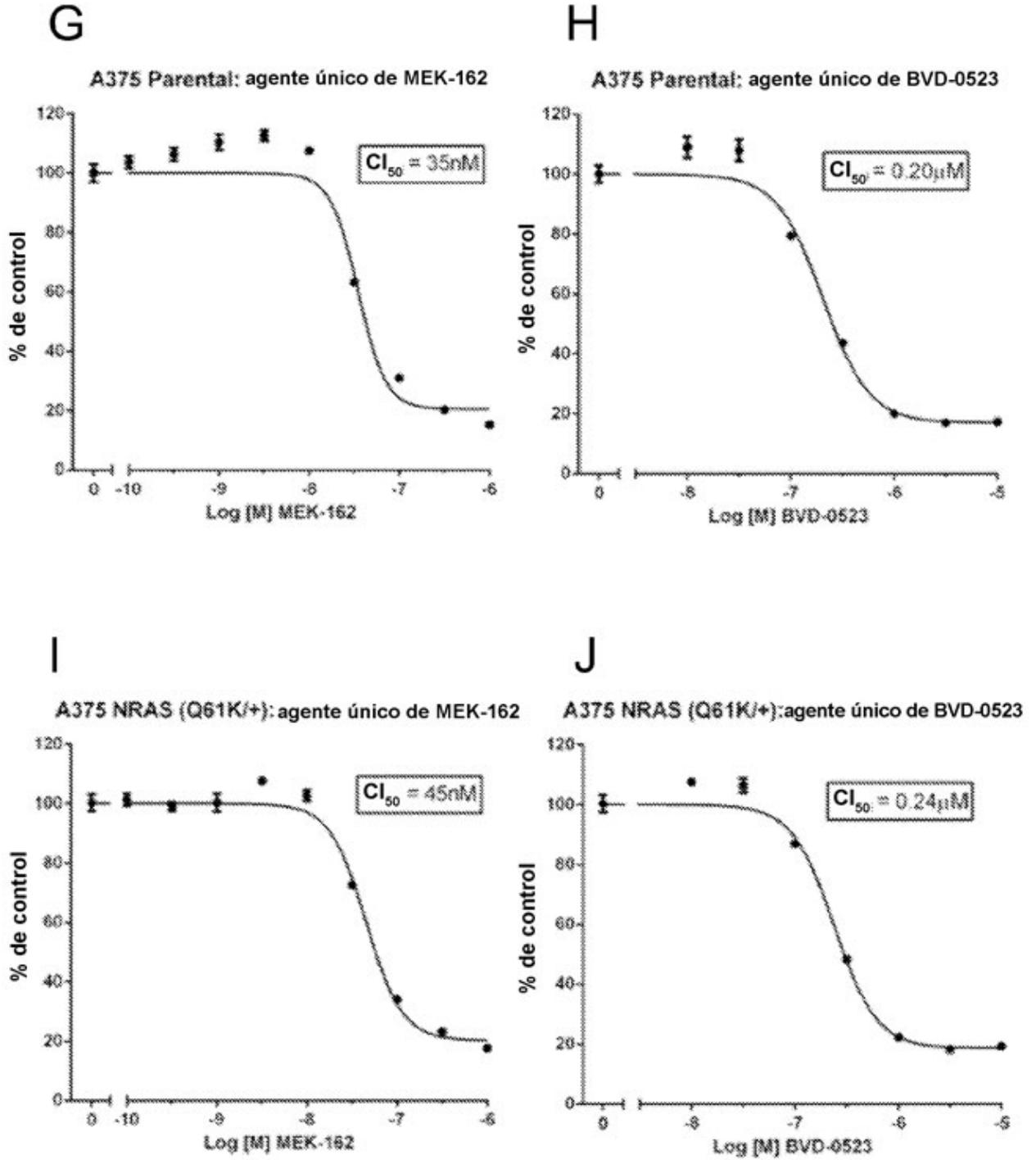


FIG. 26

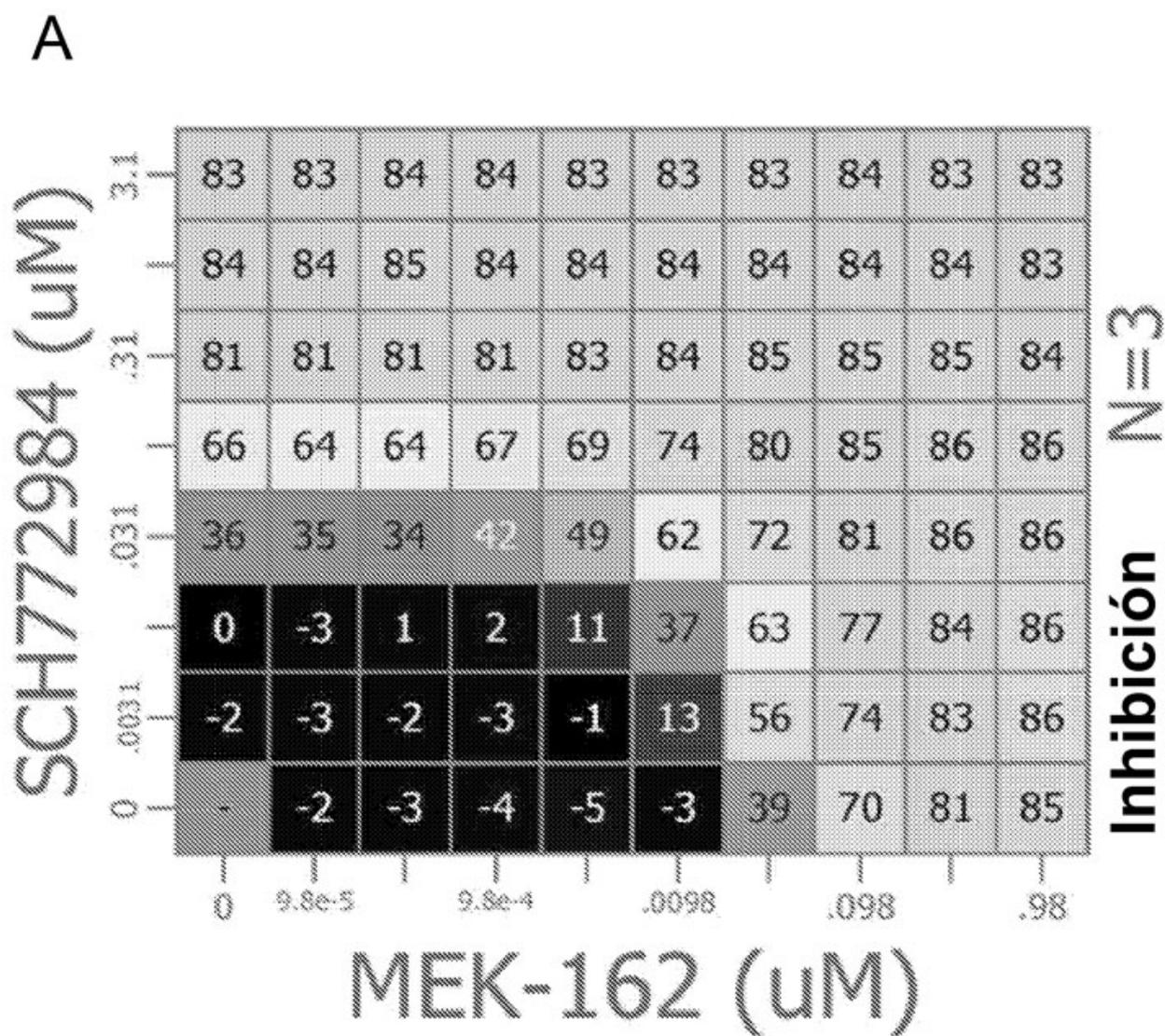
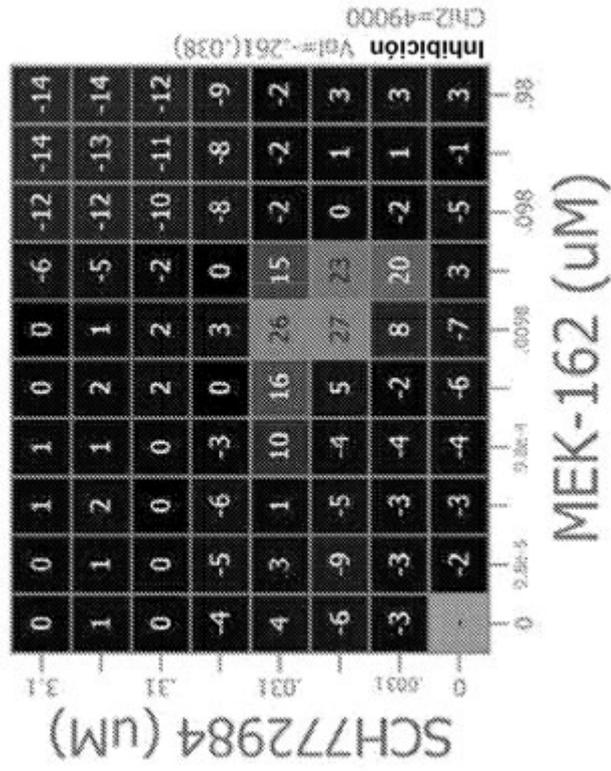


FIG. 26, Cont.

C



B

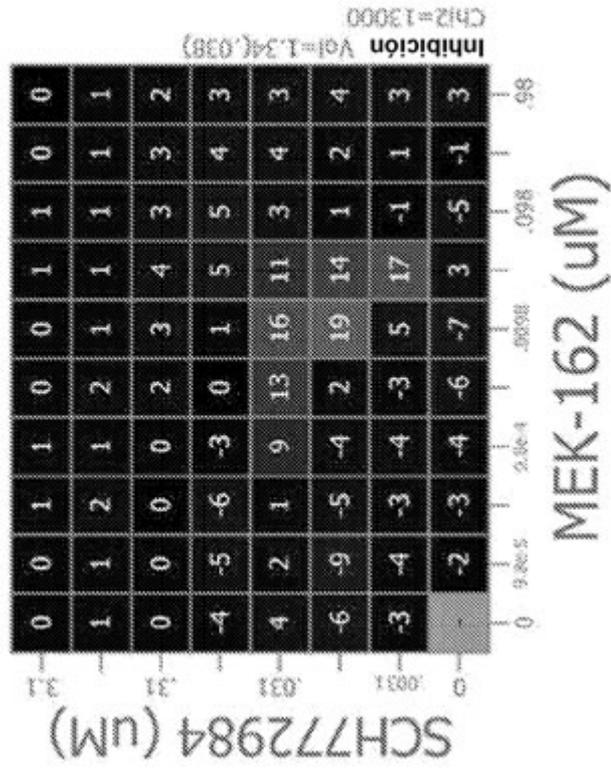


FIG. 26, Cont.

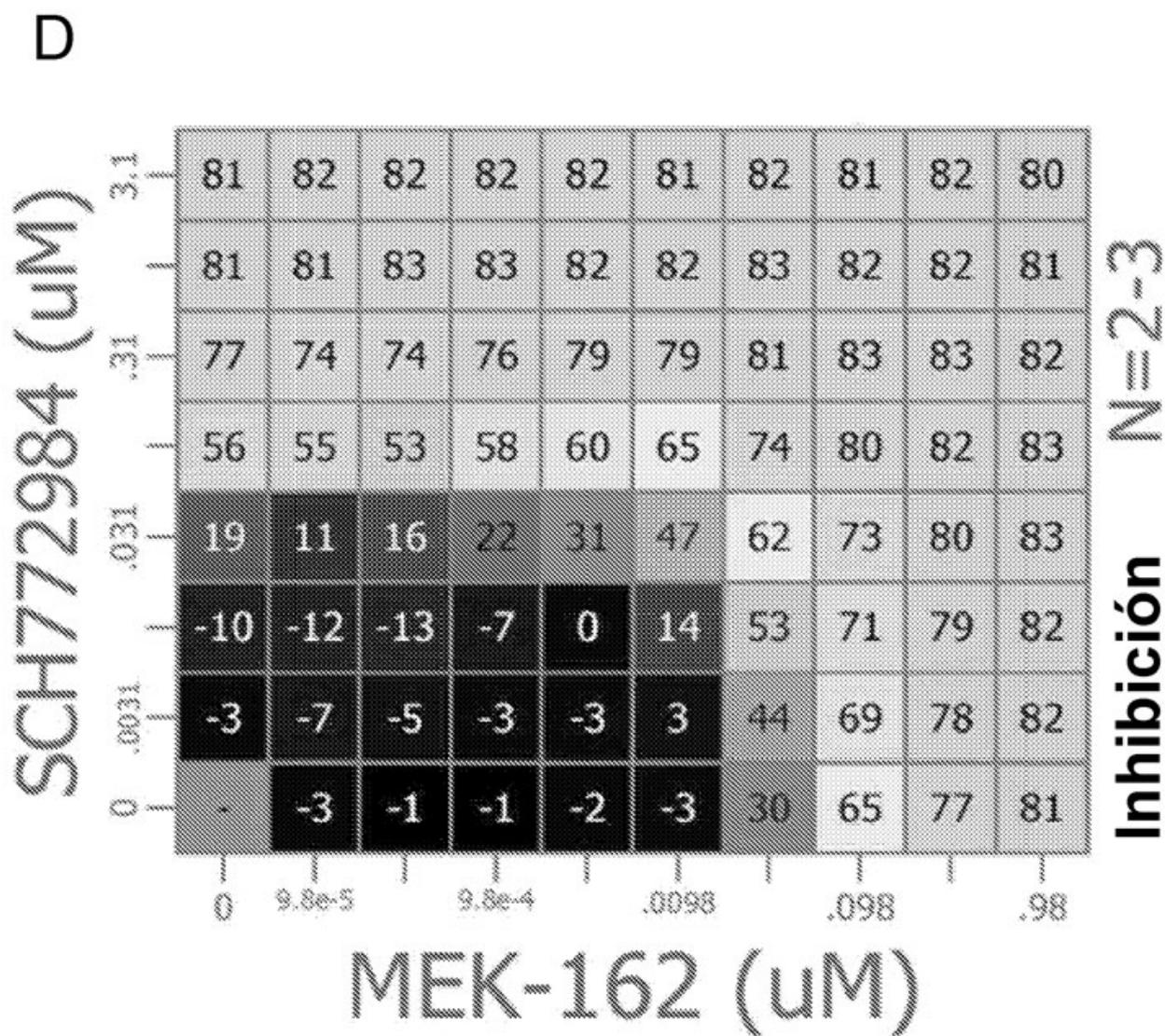




FIG. 26, Cont.

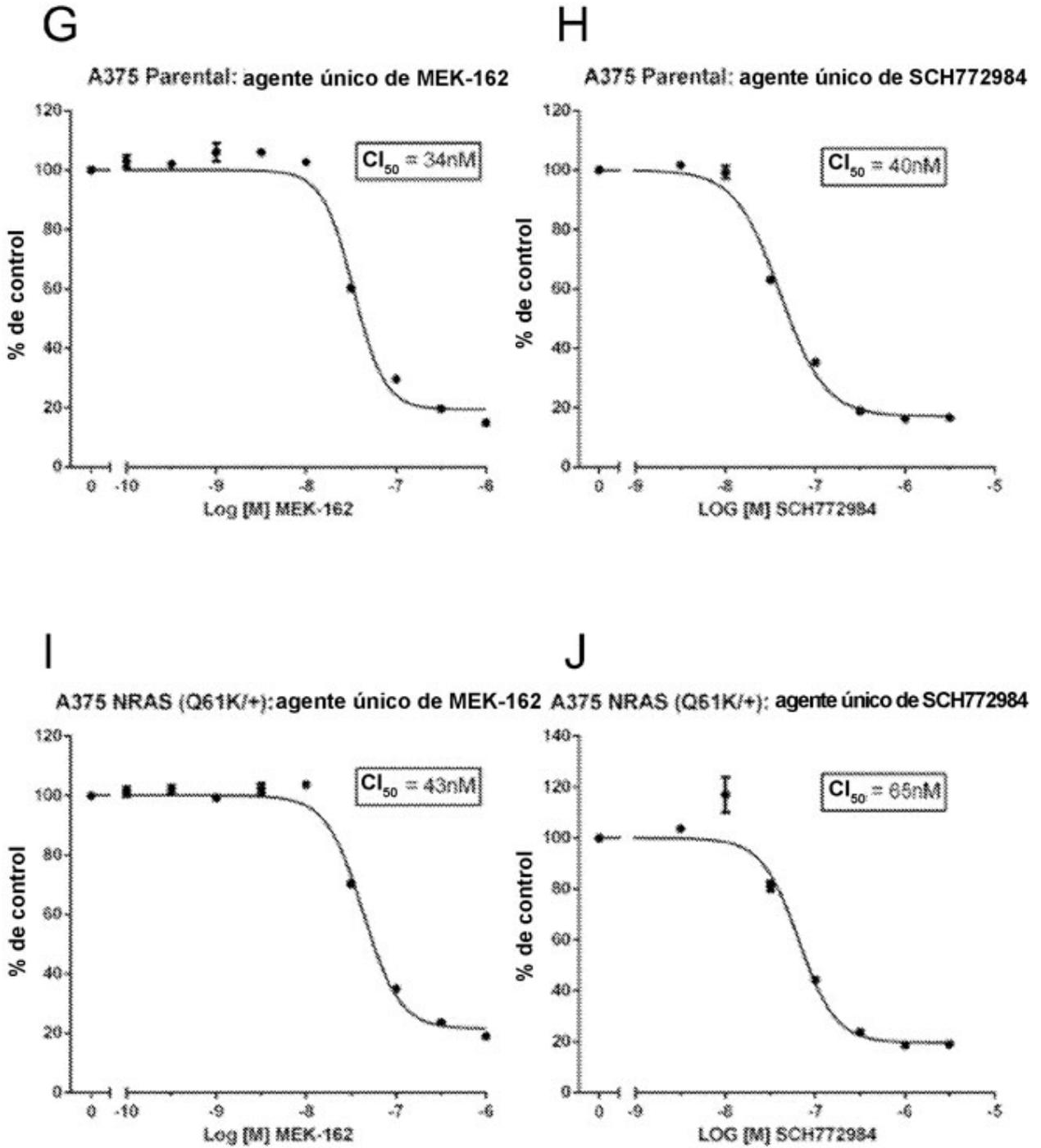


FIG. 27

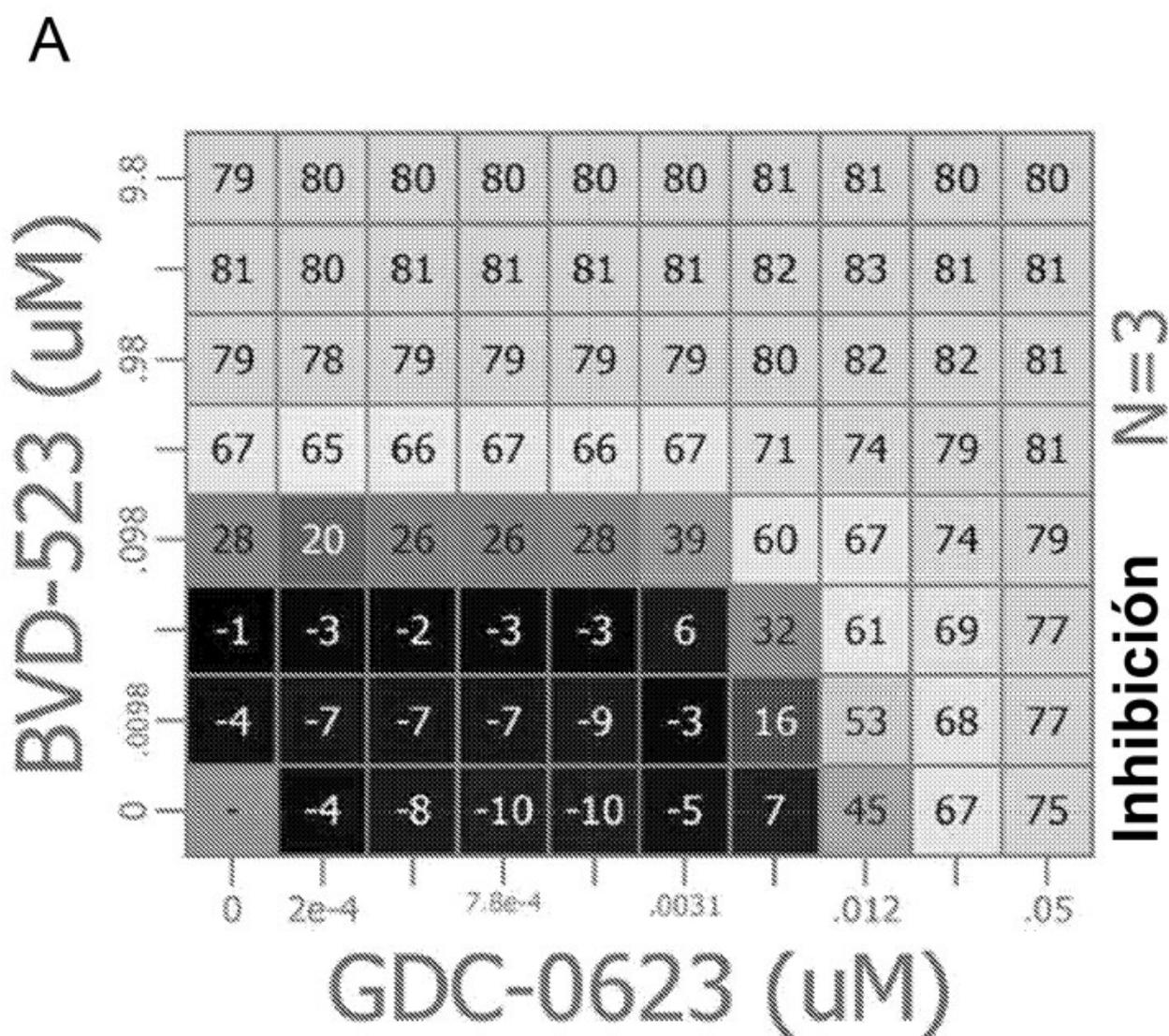
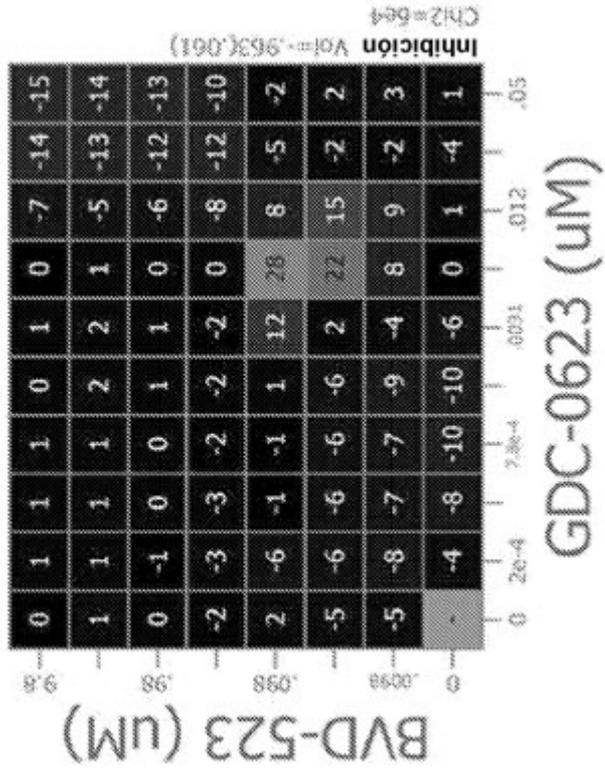


FIG. 27, Cont.

C



B

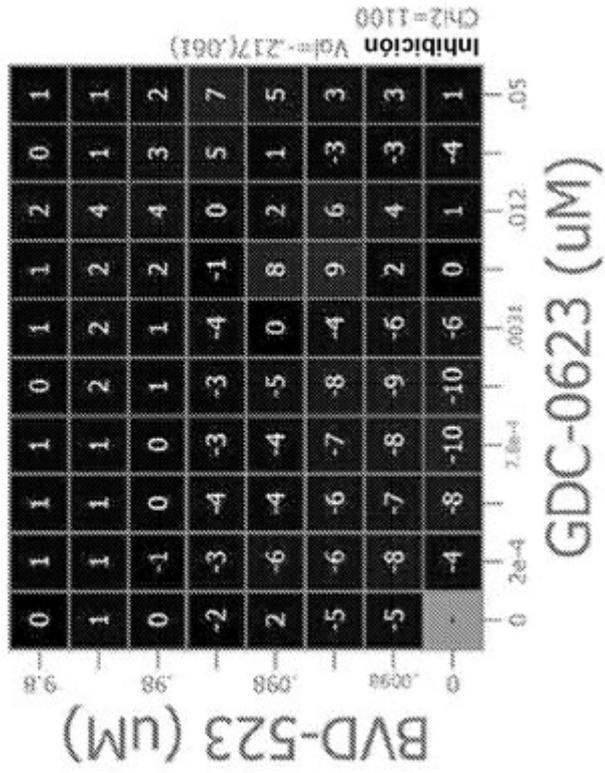


FIG. 27, Cont.

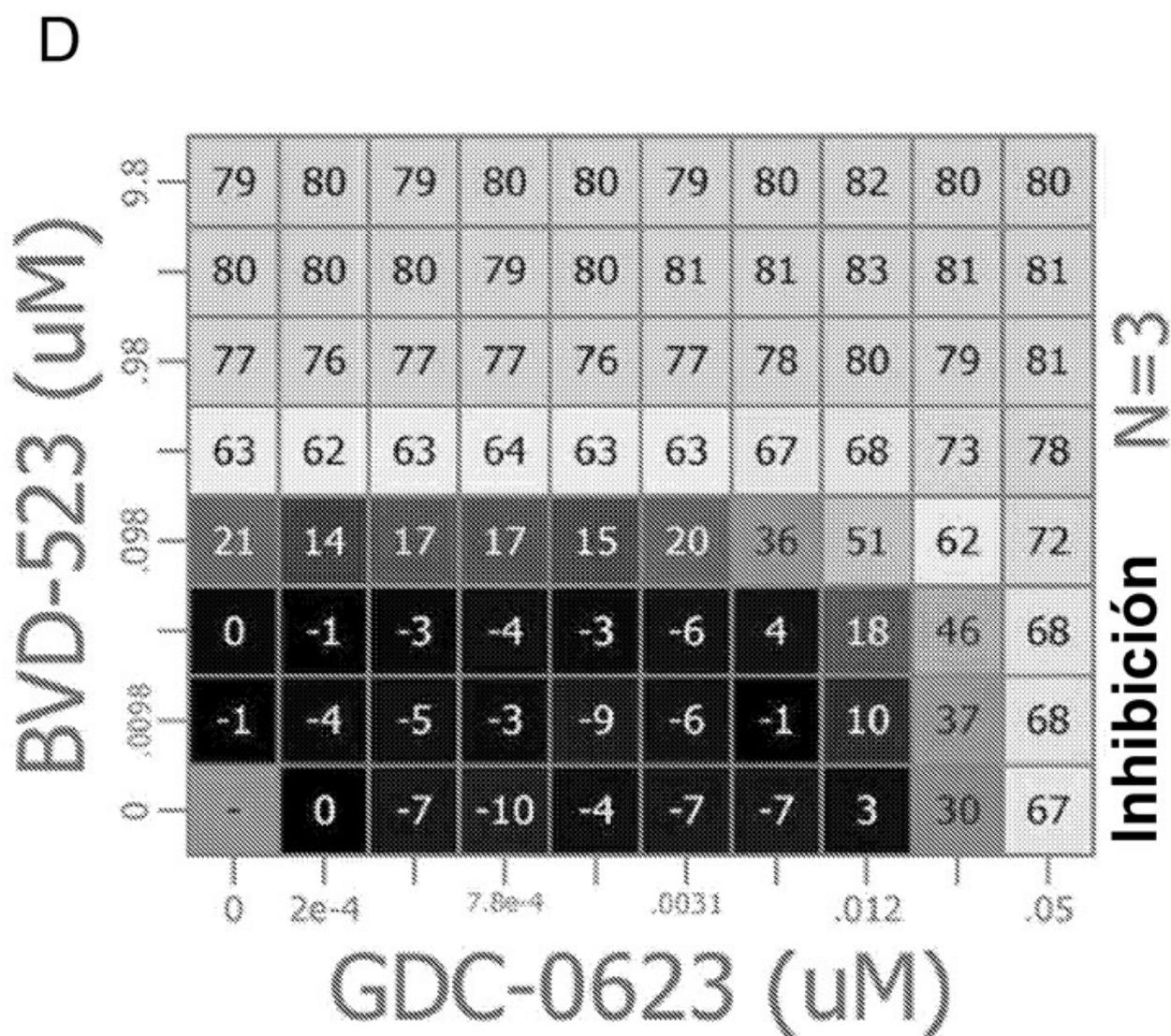
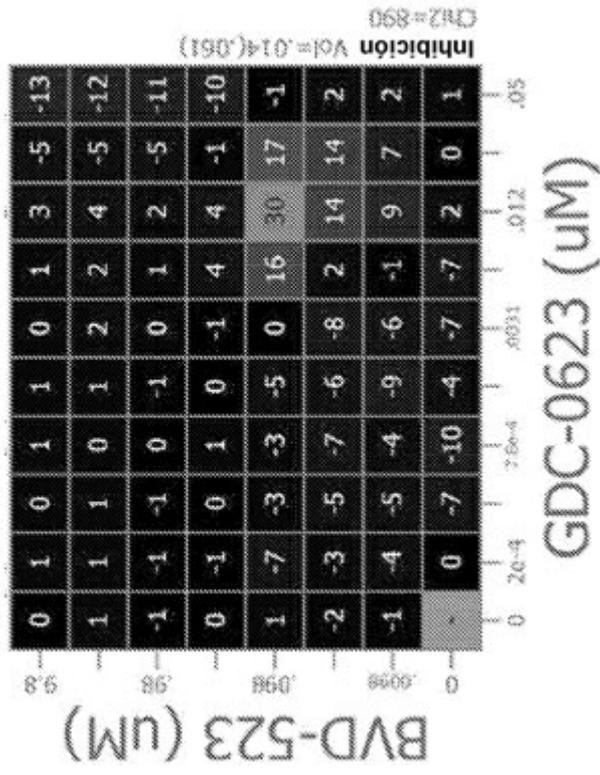


FIG. 27, Cont.

F



E

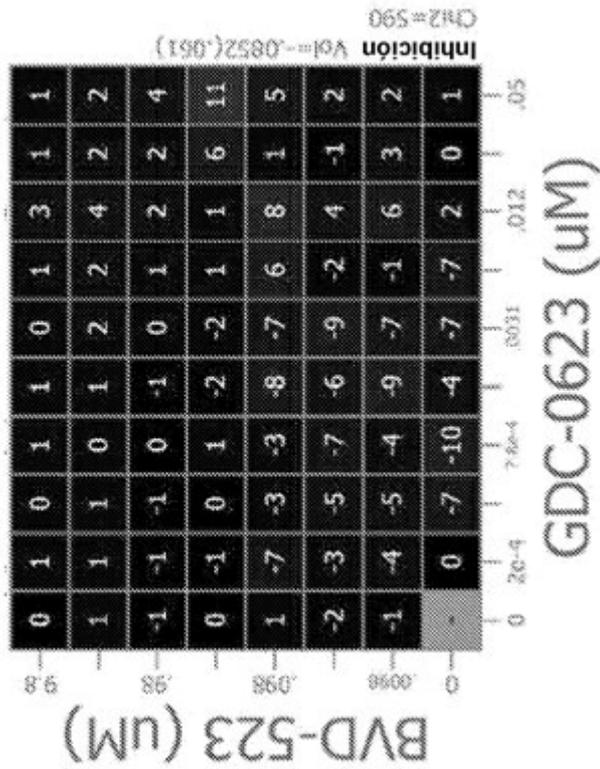


FIG. 27, Cont.

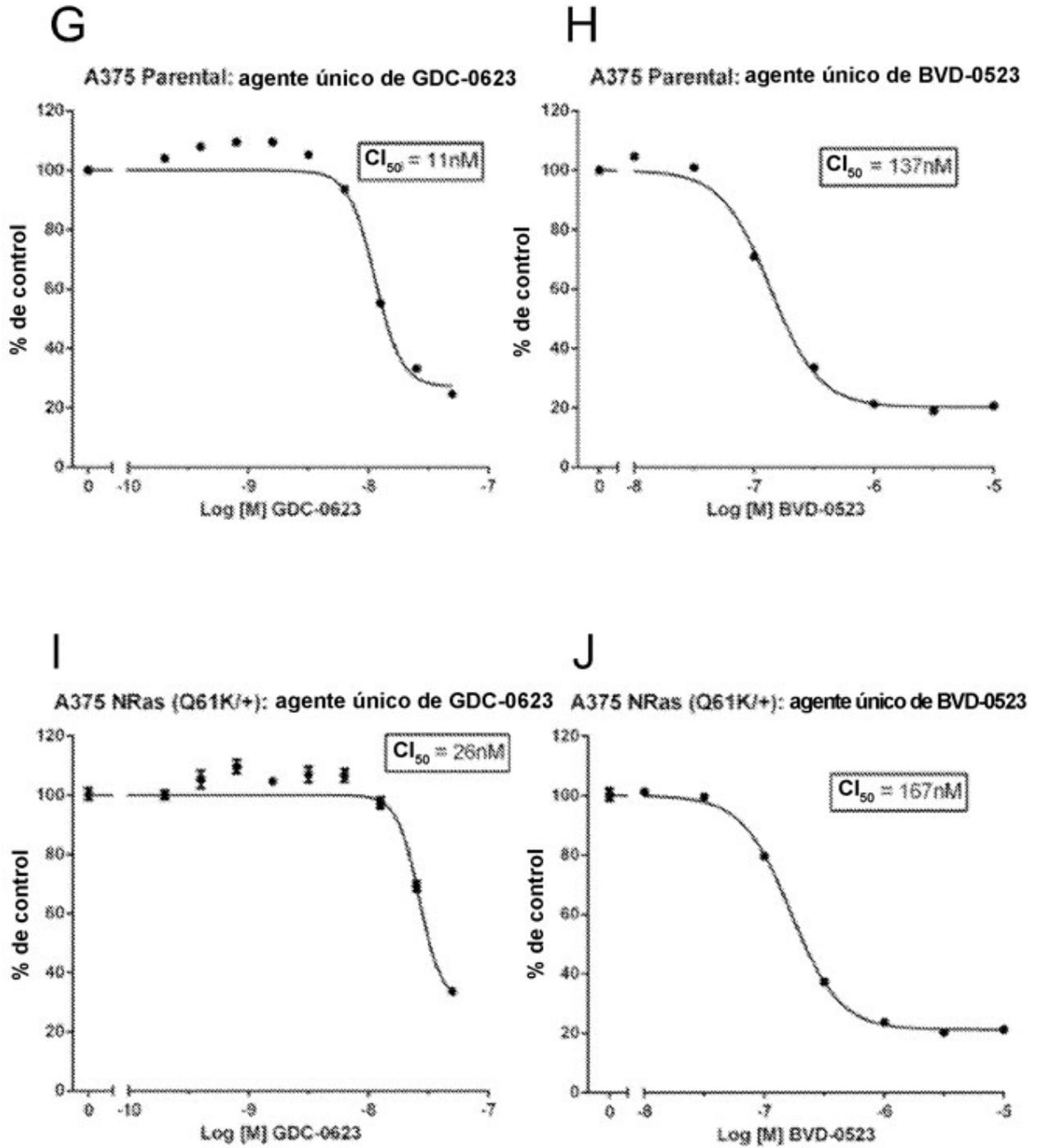


FIG. 28

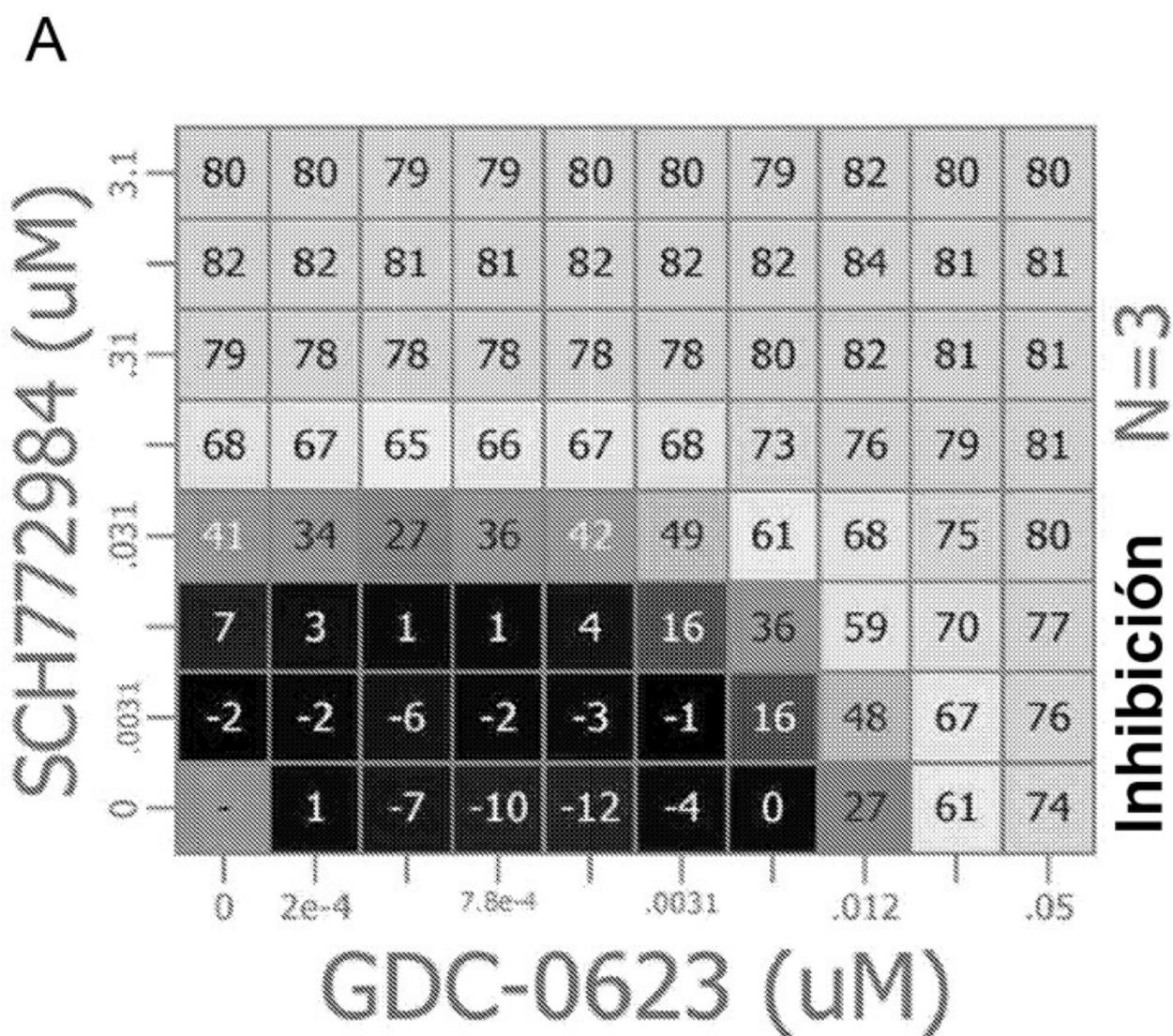


FIG. 28, Cont.

B



C



FIG. 28, Cont.

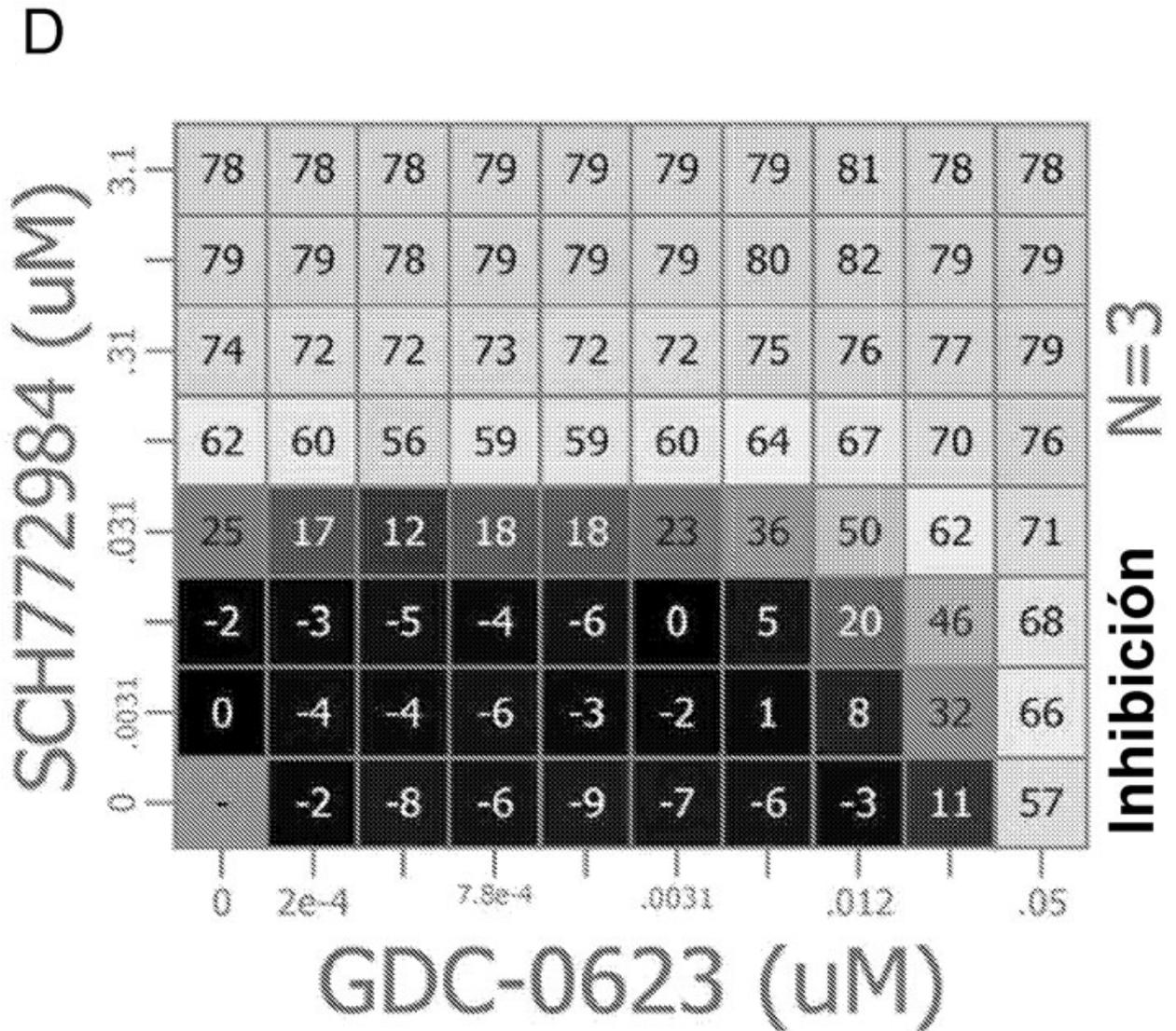
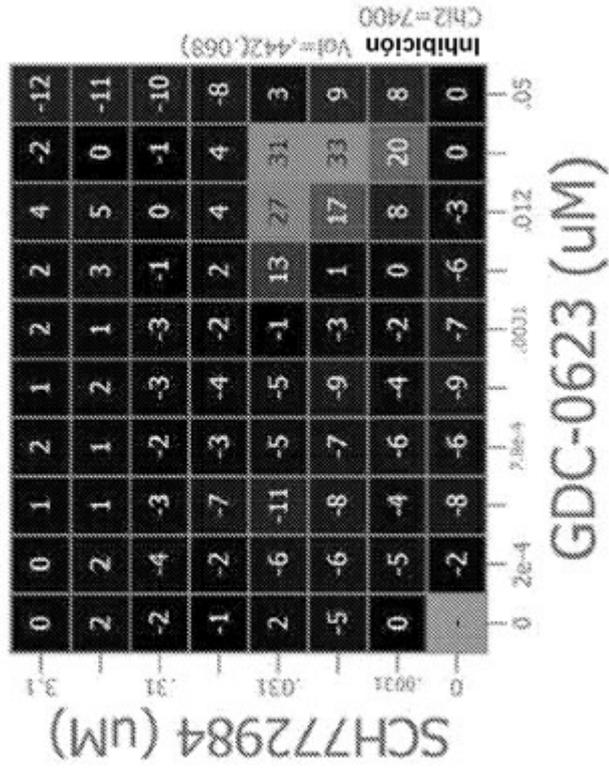


FIG. 28, Cont.

F



E

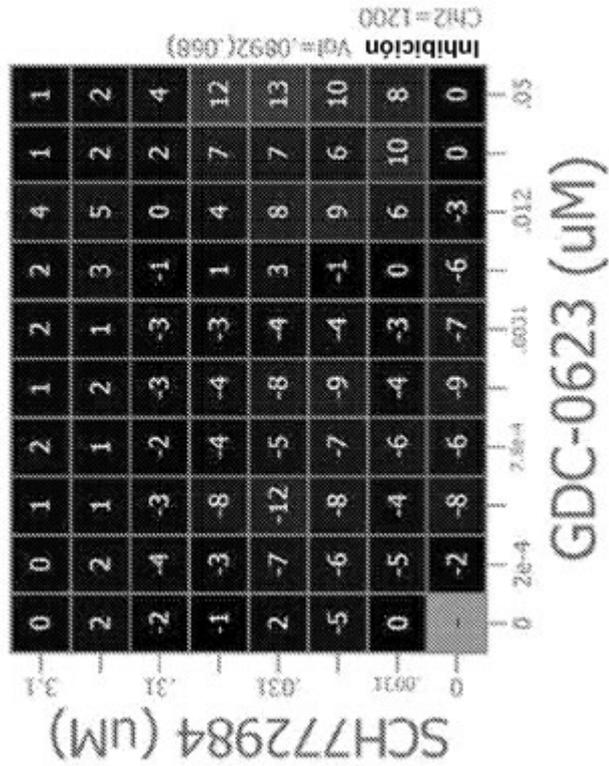


FIG. 28, Cont.

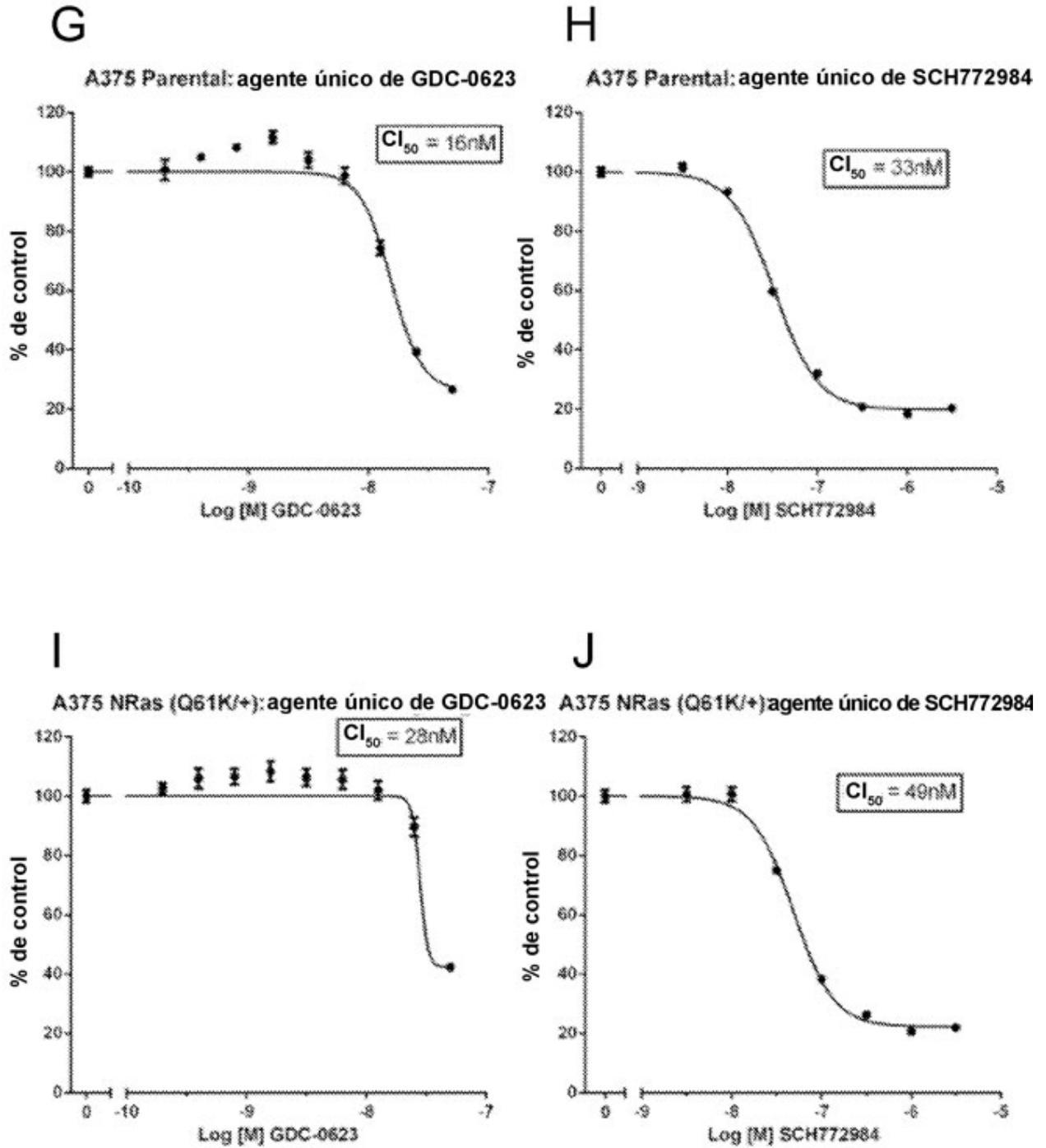


FIG. 29

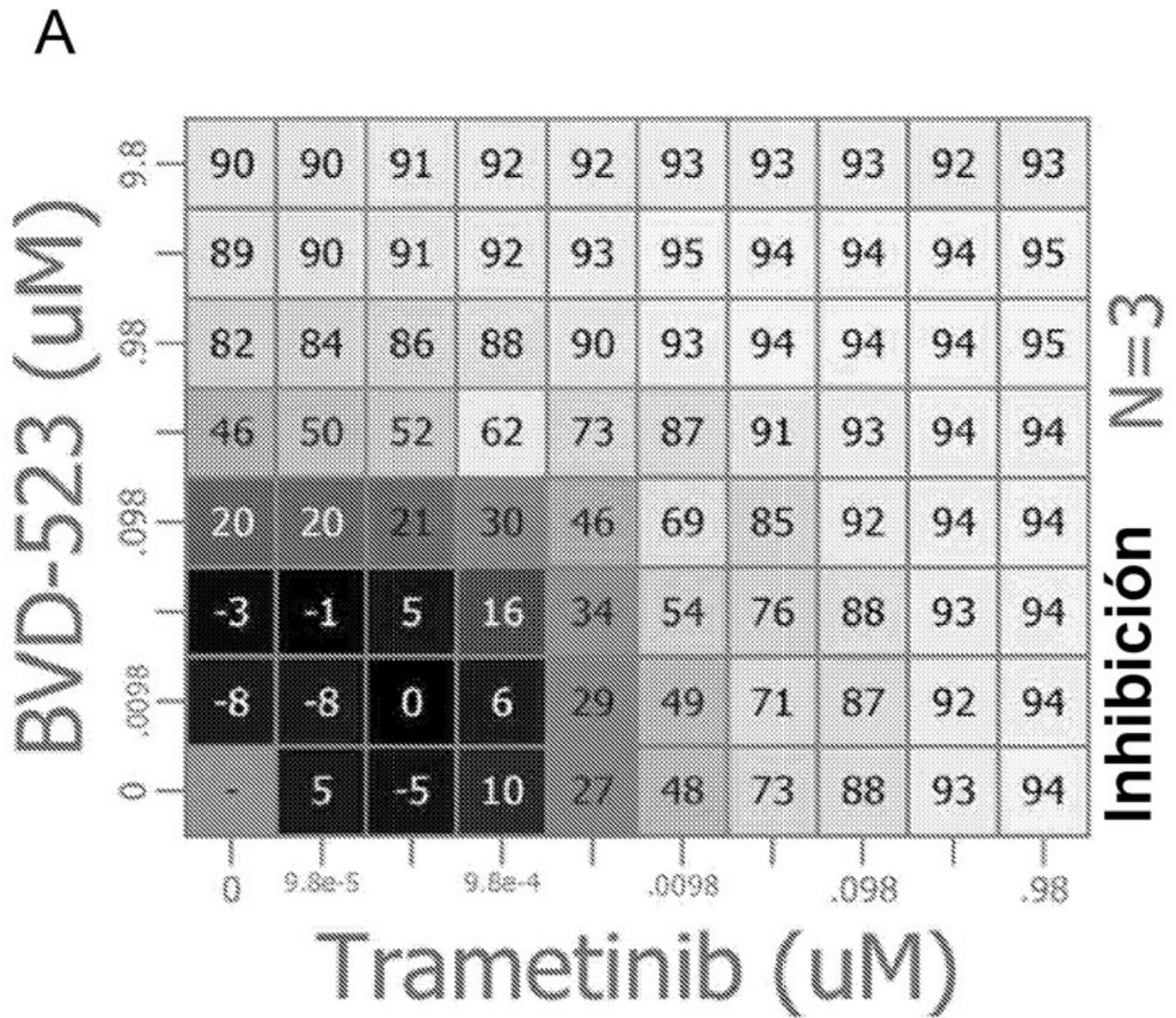




FIG. 29, Cont.

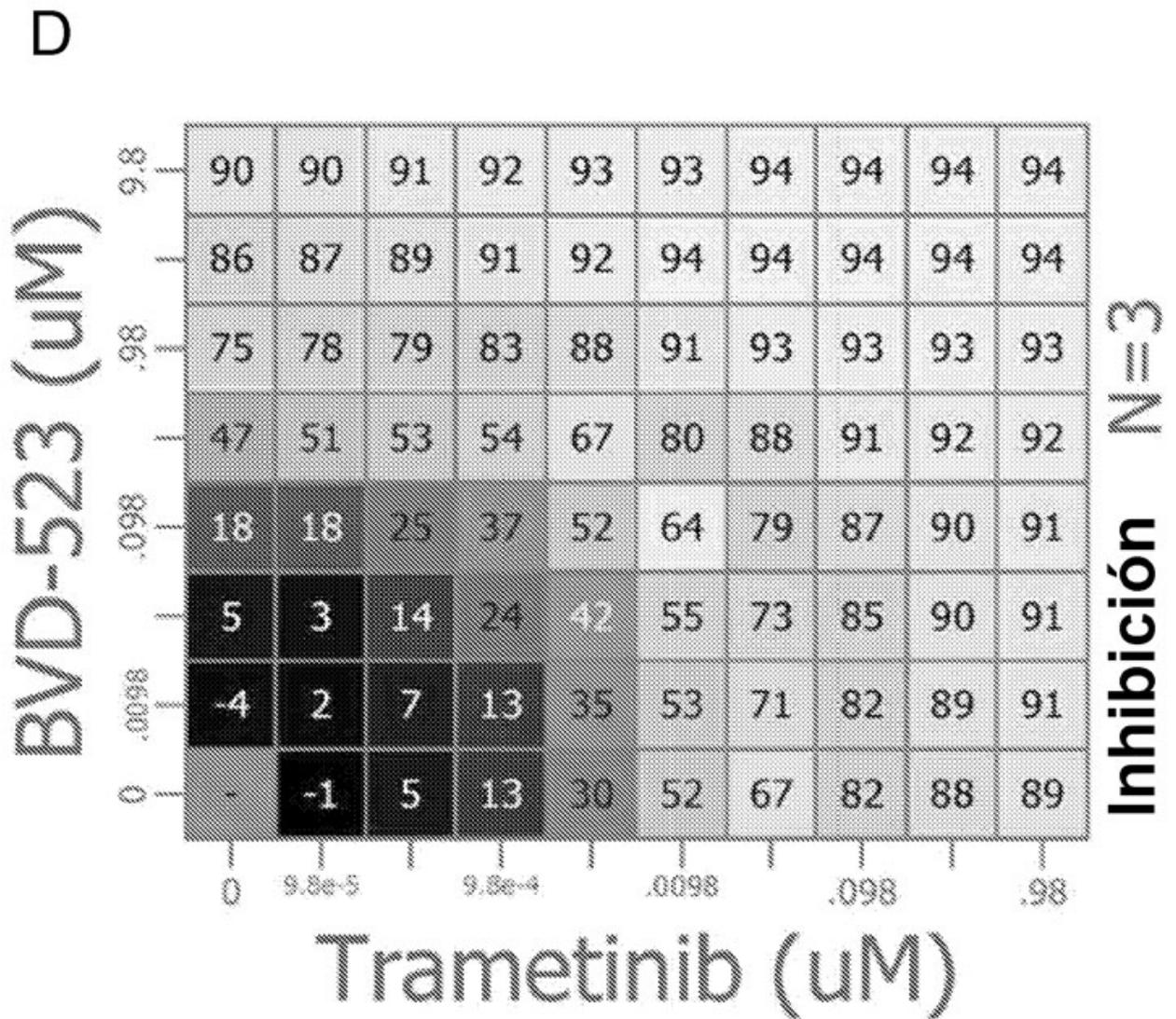
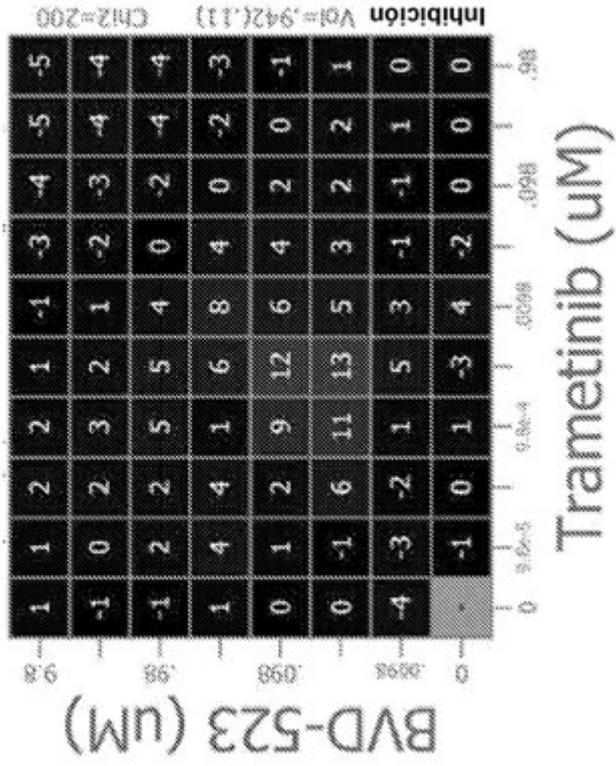


FIG. 29, Cont.

F



E

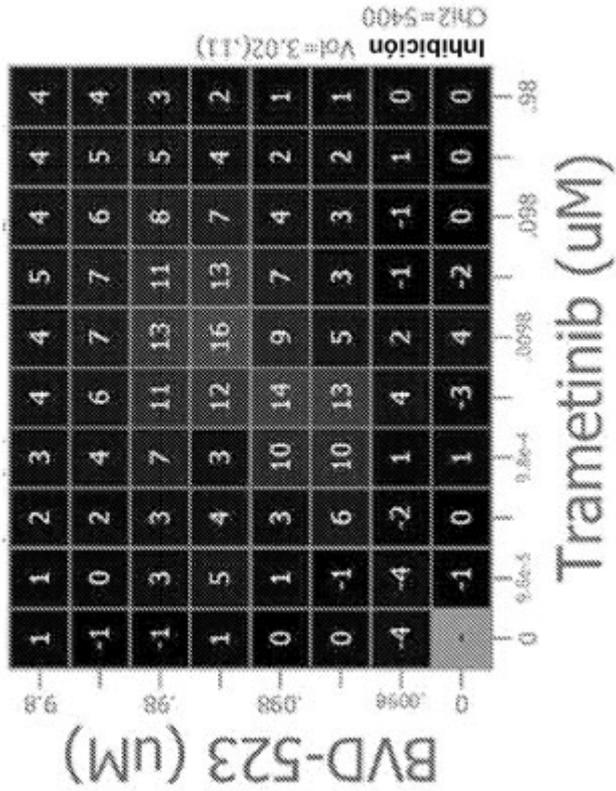


FIG. 29, Cont.

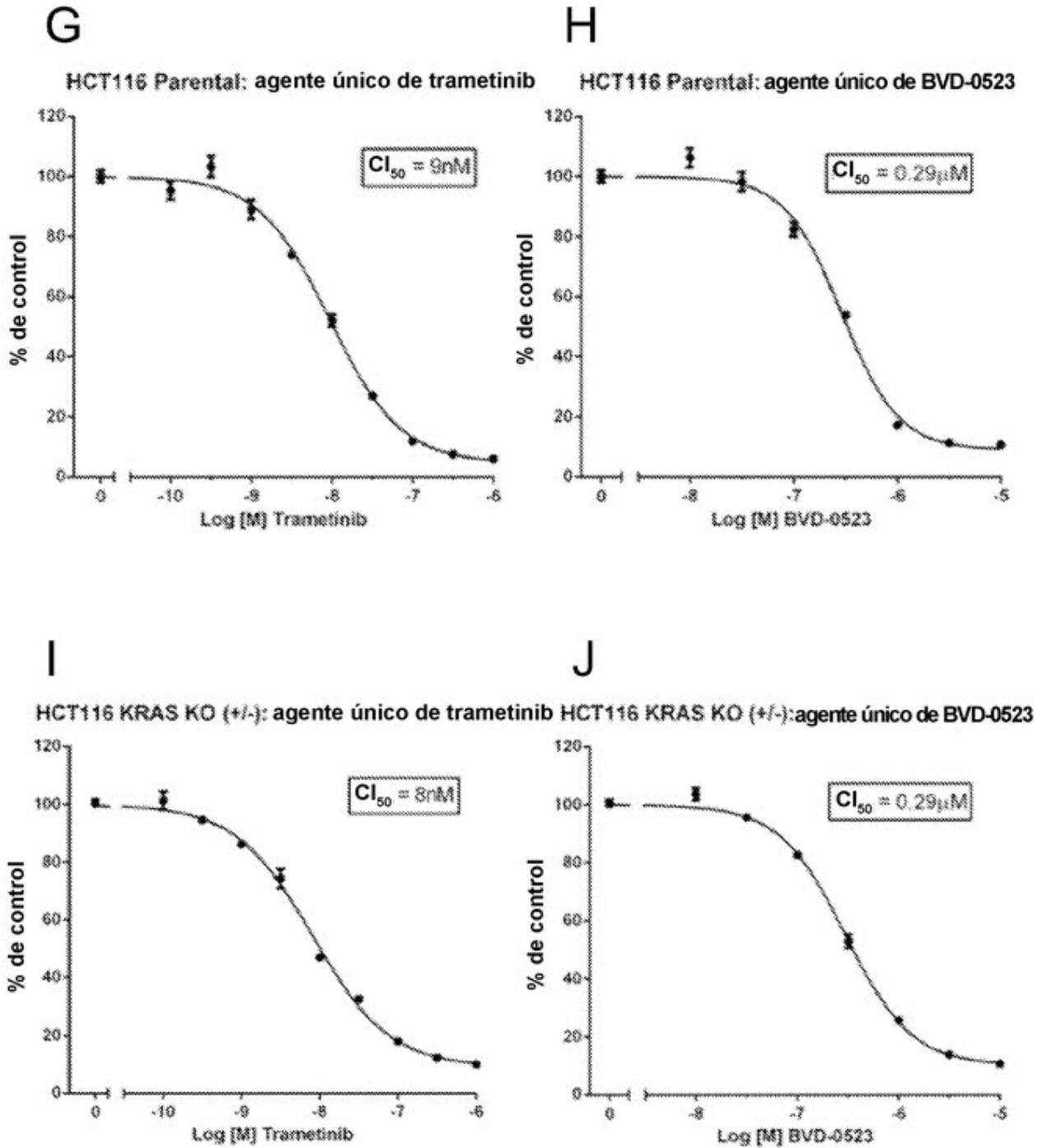


FIG. 30

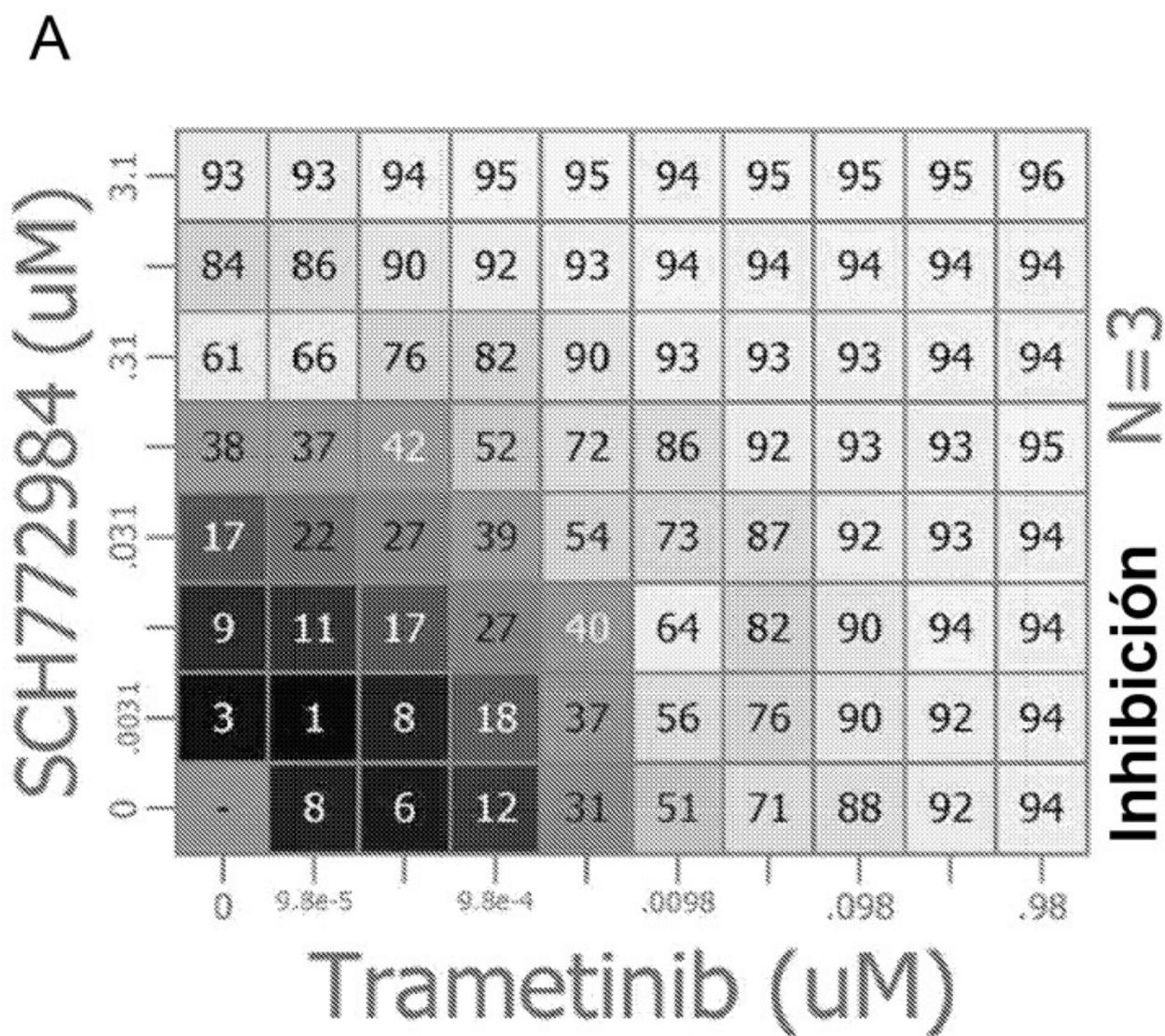
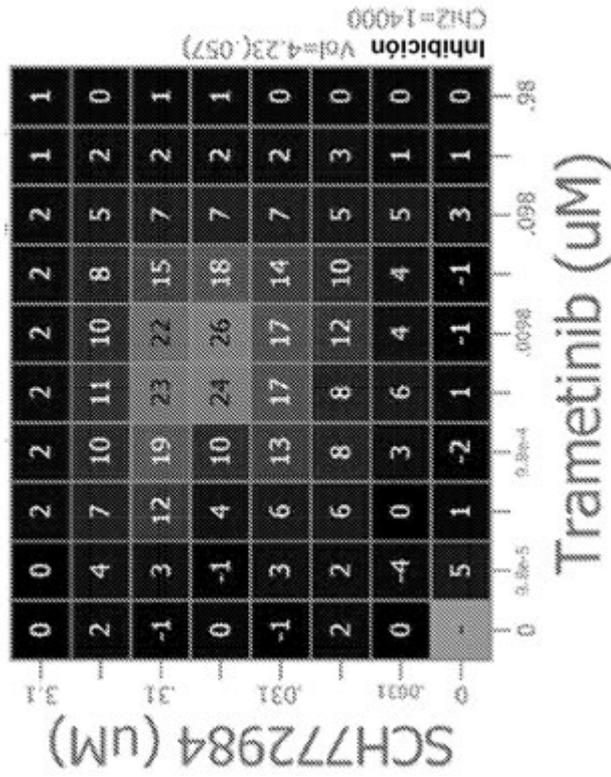


FIG. 30, Cont.

B



C

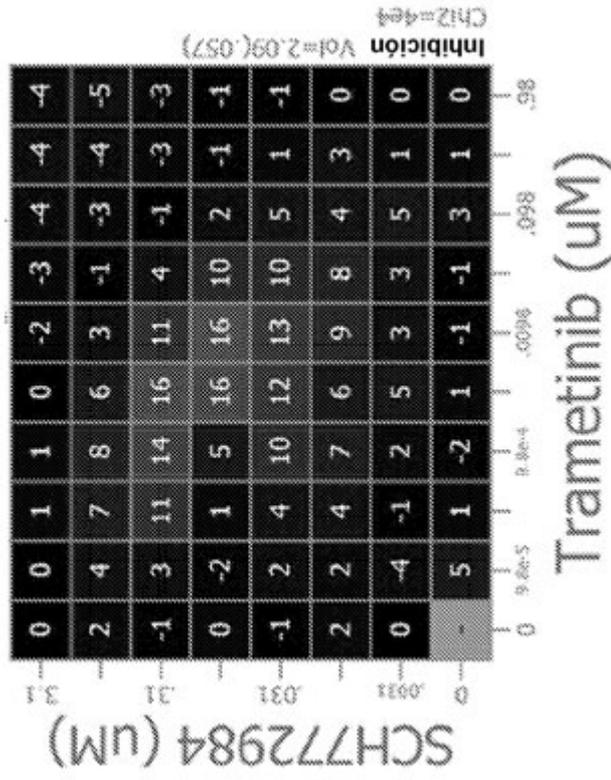


FIG. 30, Cont.

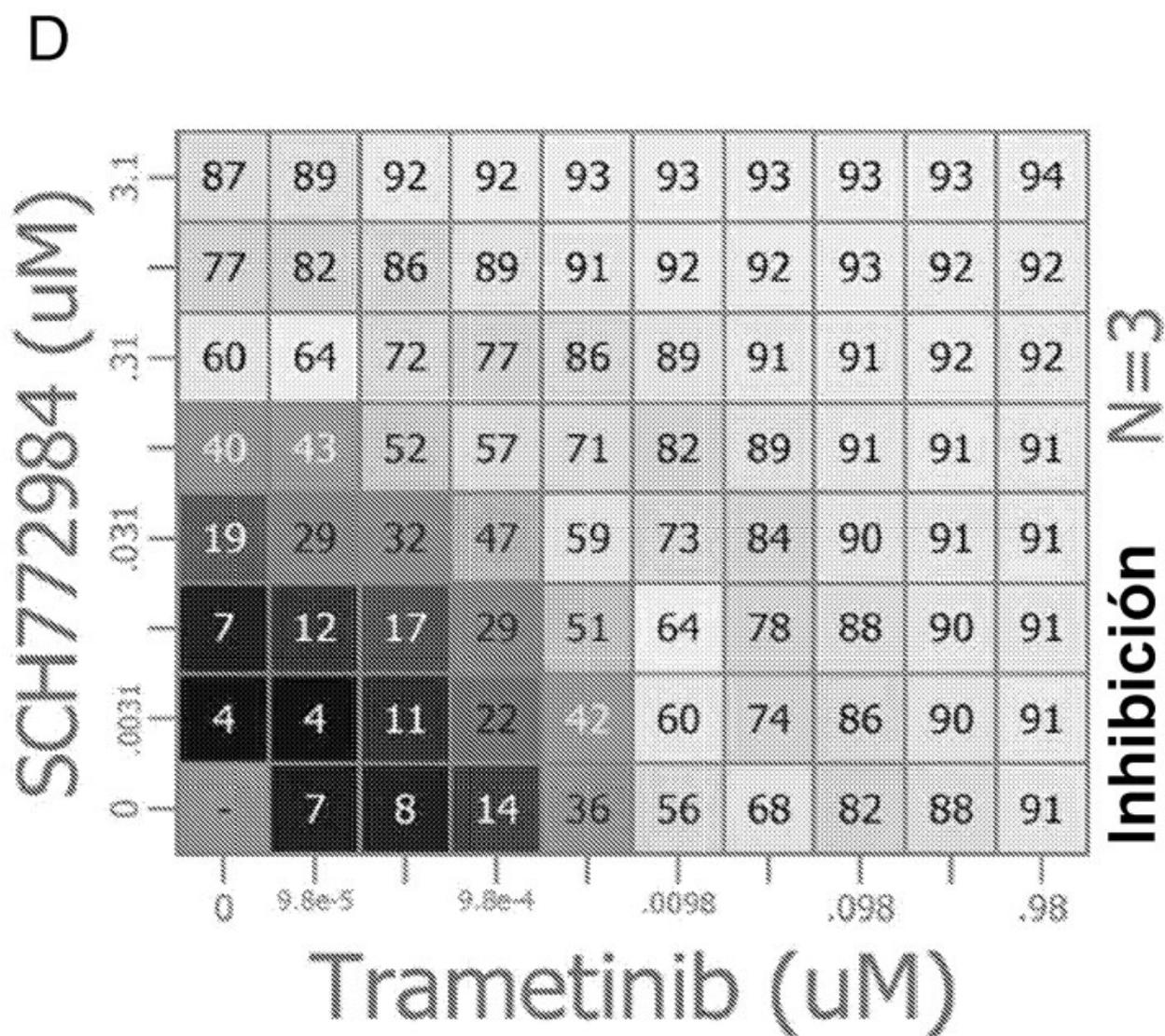




FIG. 30, Cont.

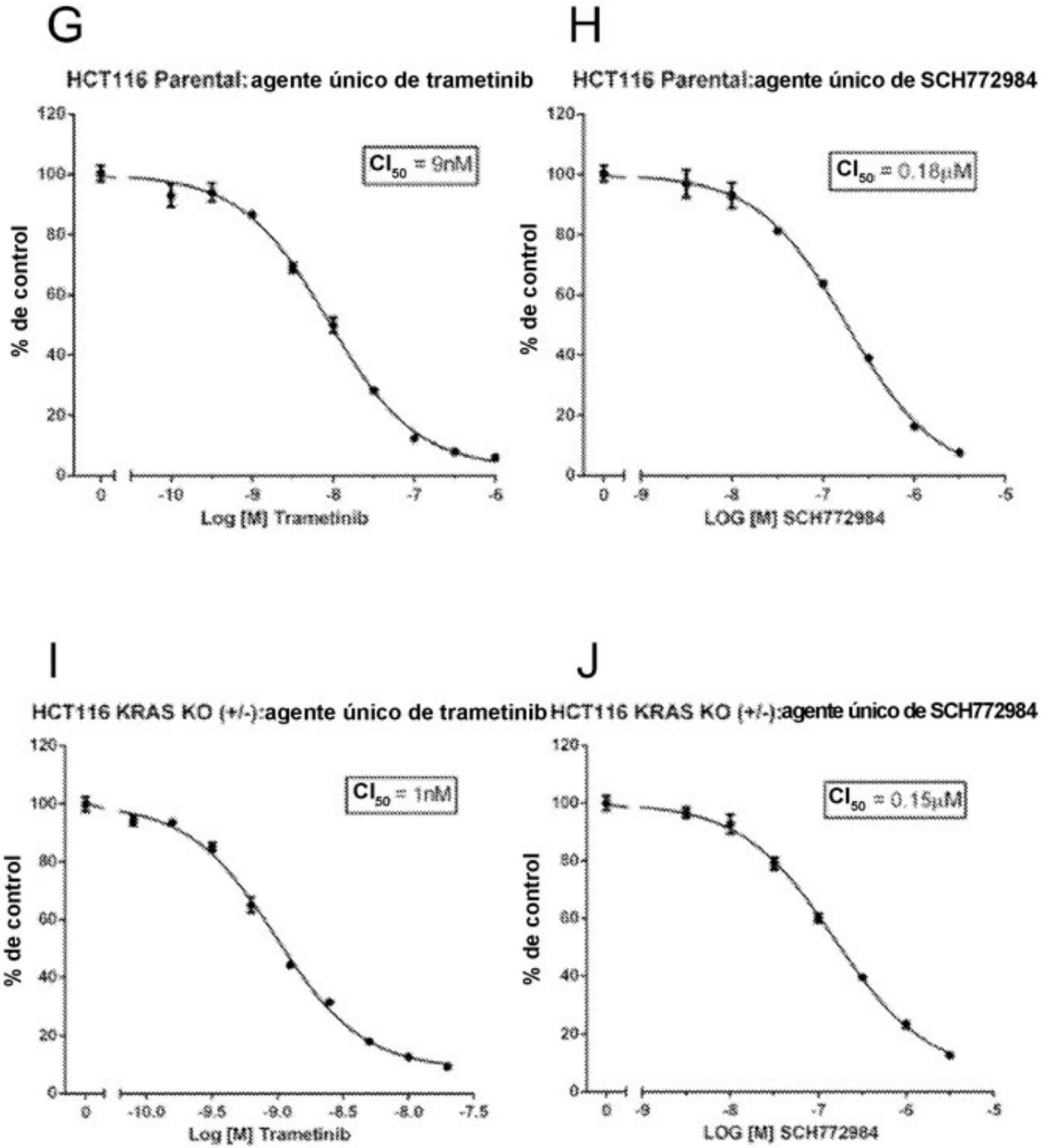


FIG. 31

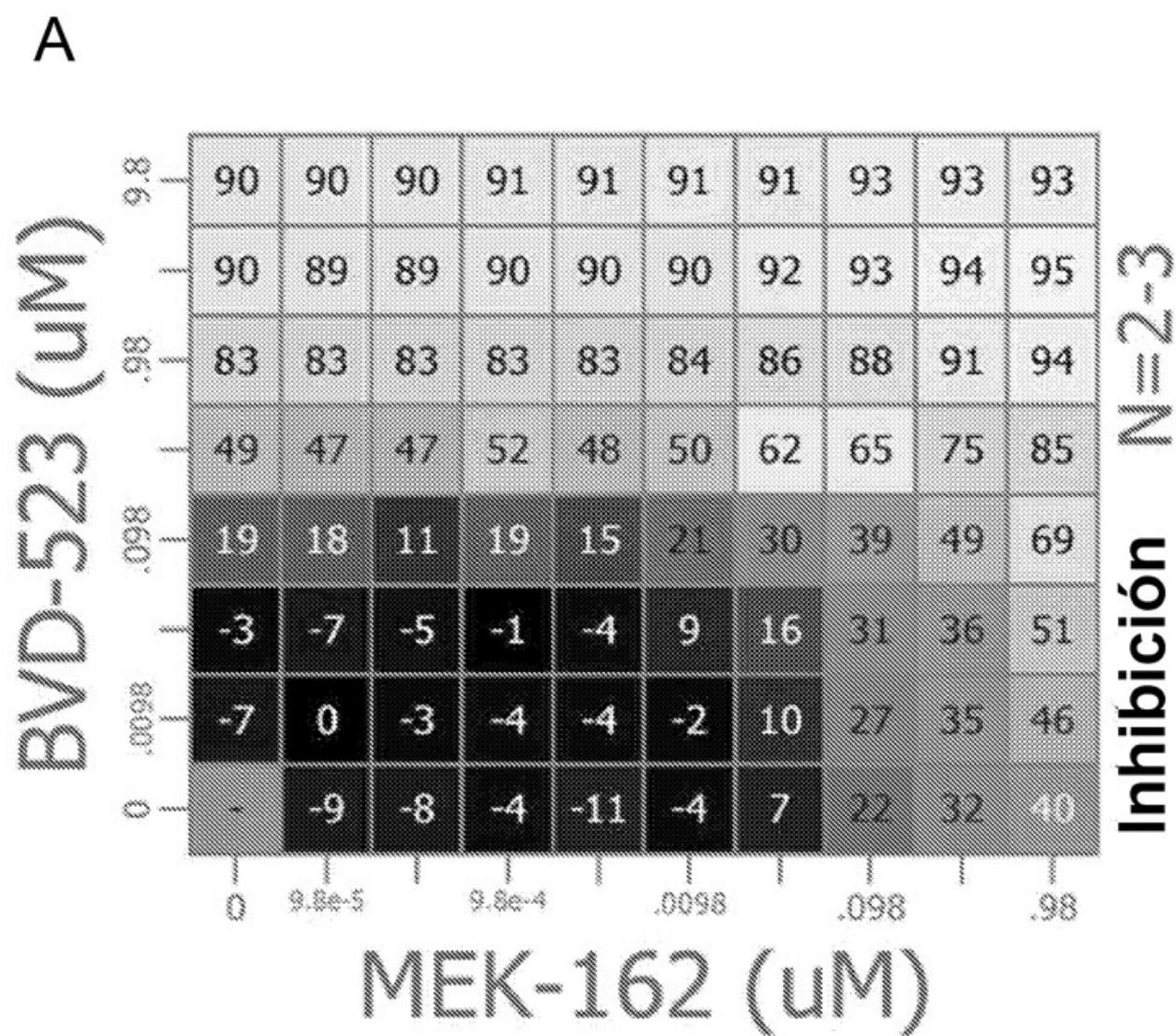


FIG. 31, Cont.

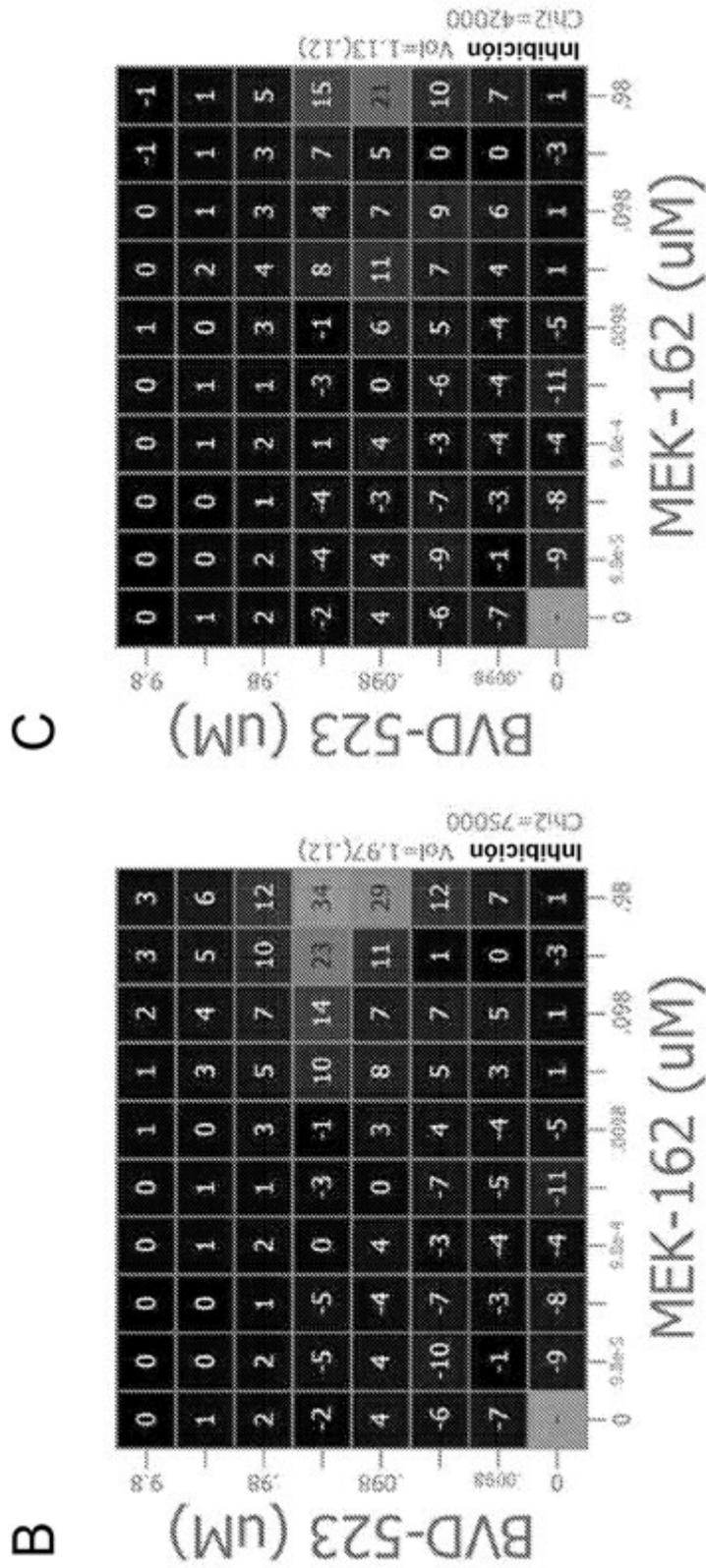


FIG. 31, Cont.

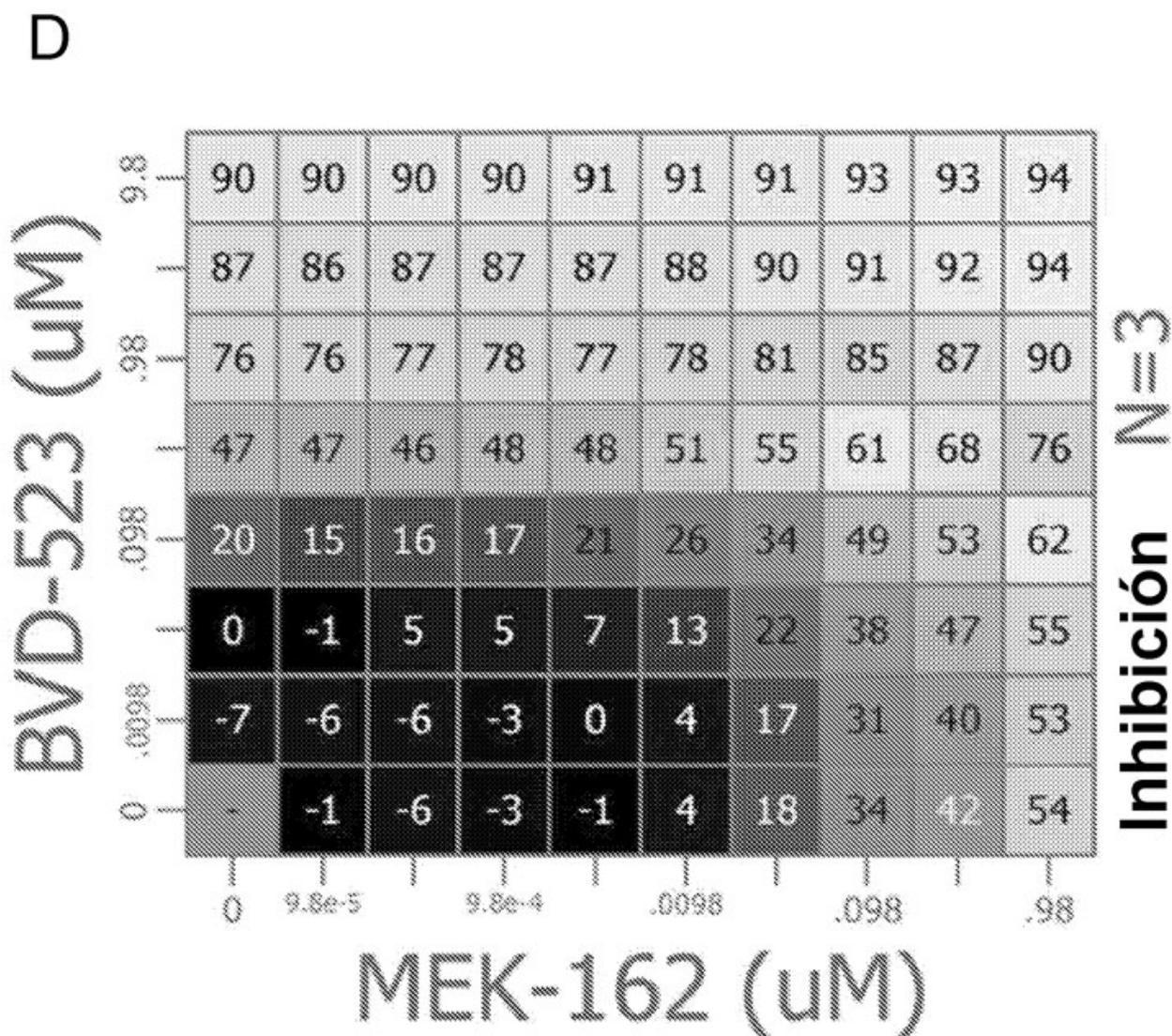
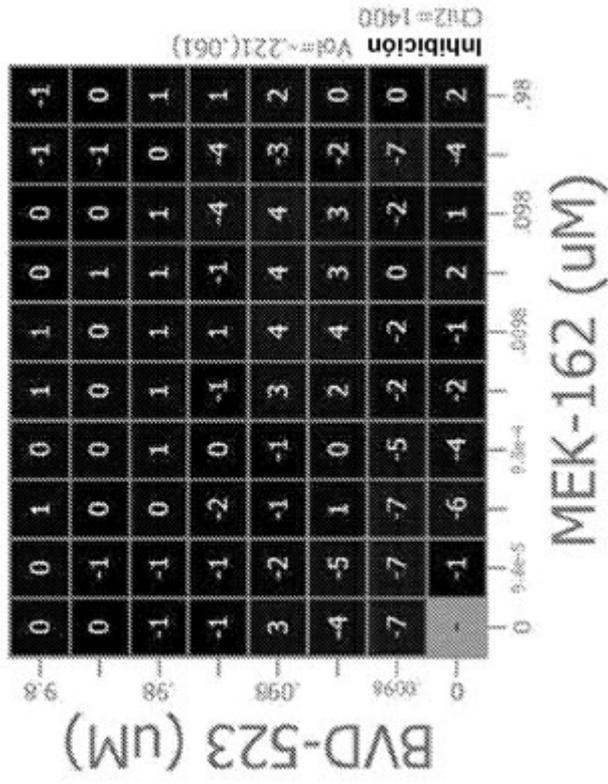


FIG. 31, Cont.

F



E

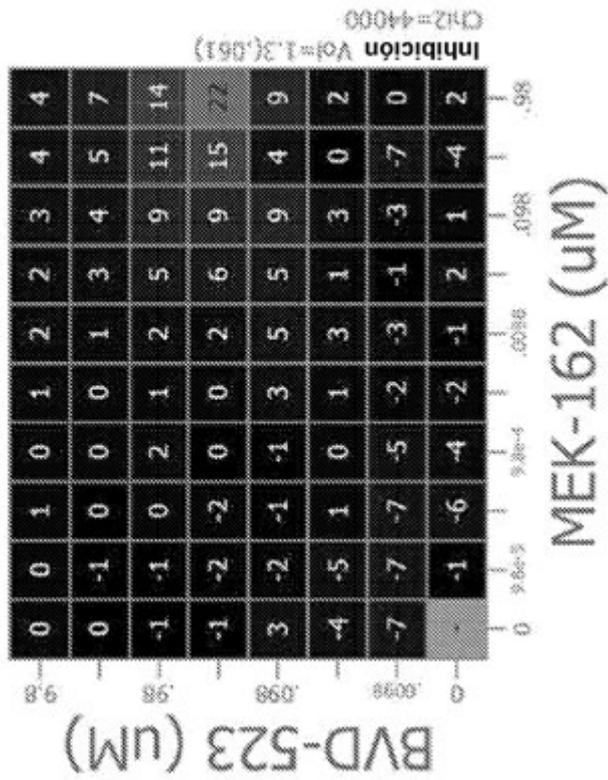


FIG. 31, Cont.

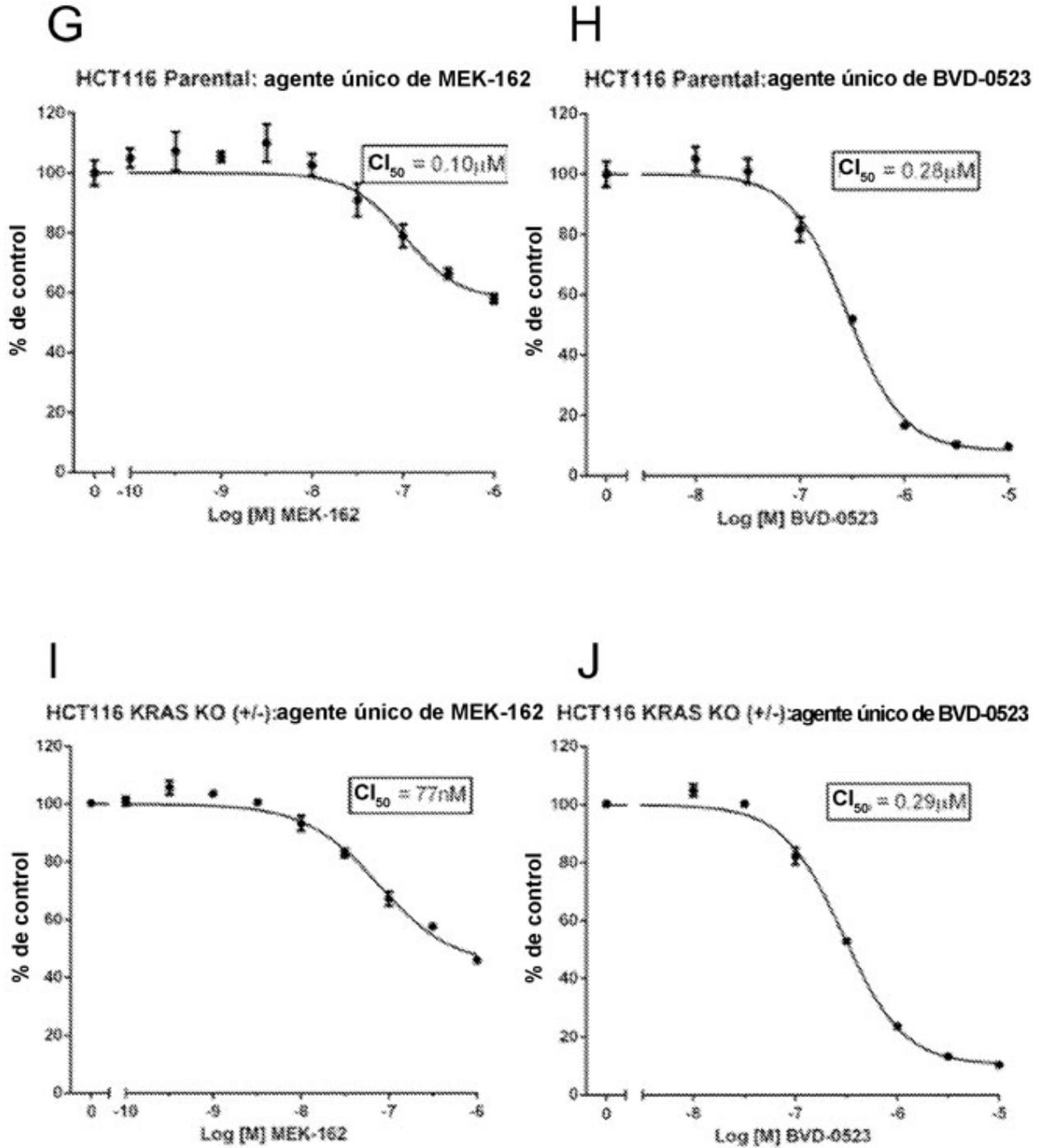


FIG. 32

A

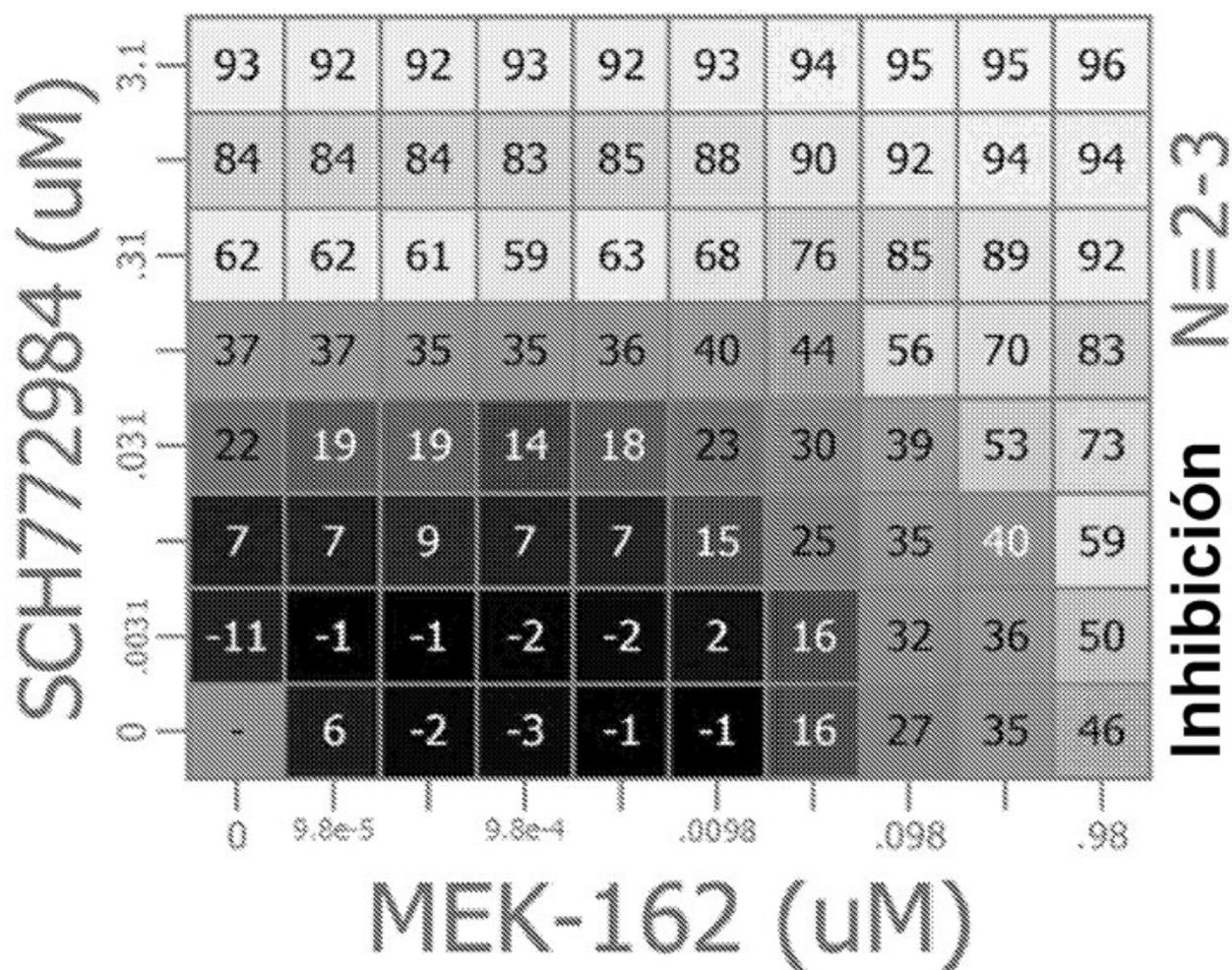
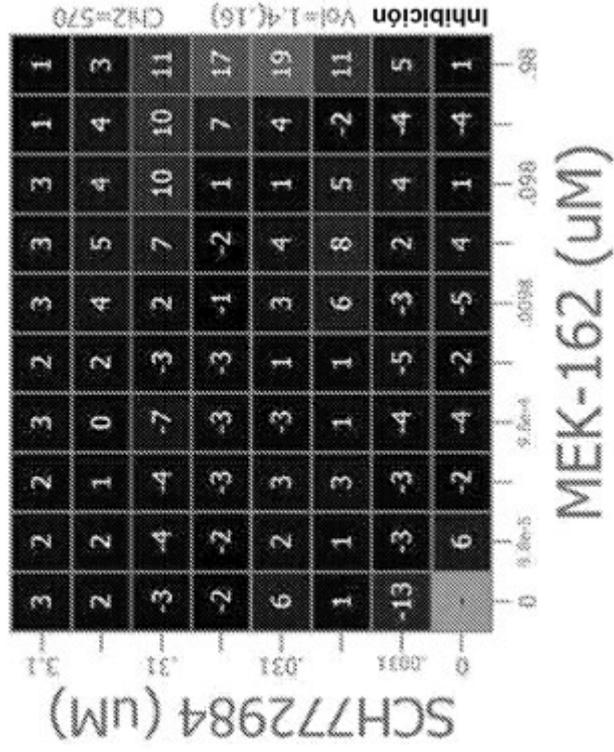


FIG. 32, Cont.

C



B

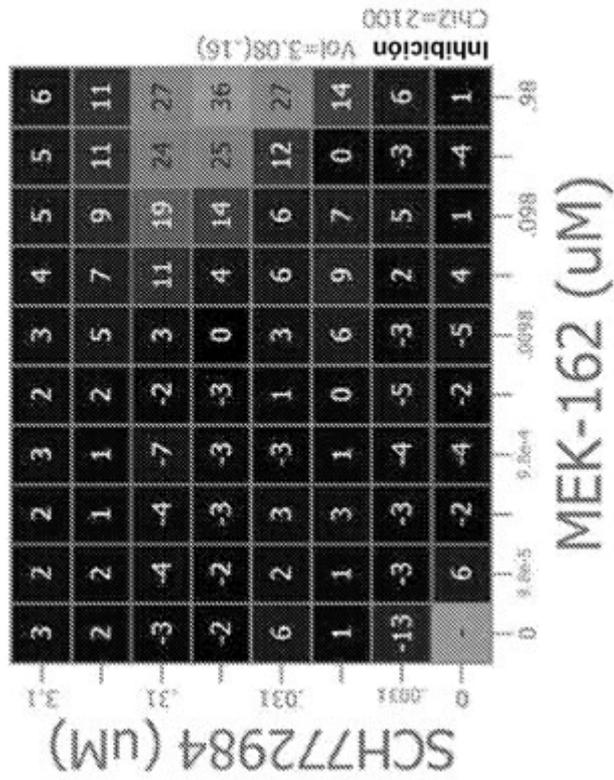


FIG. 32, Cont.

D

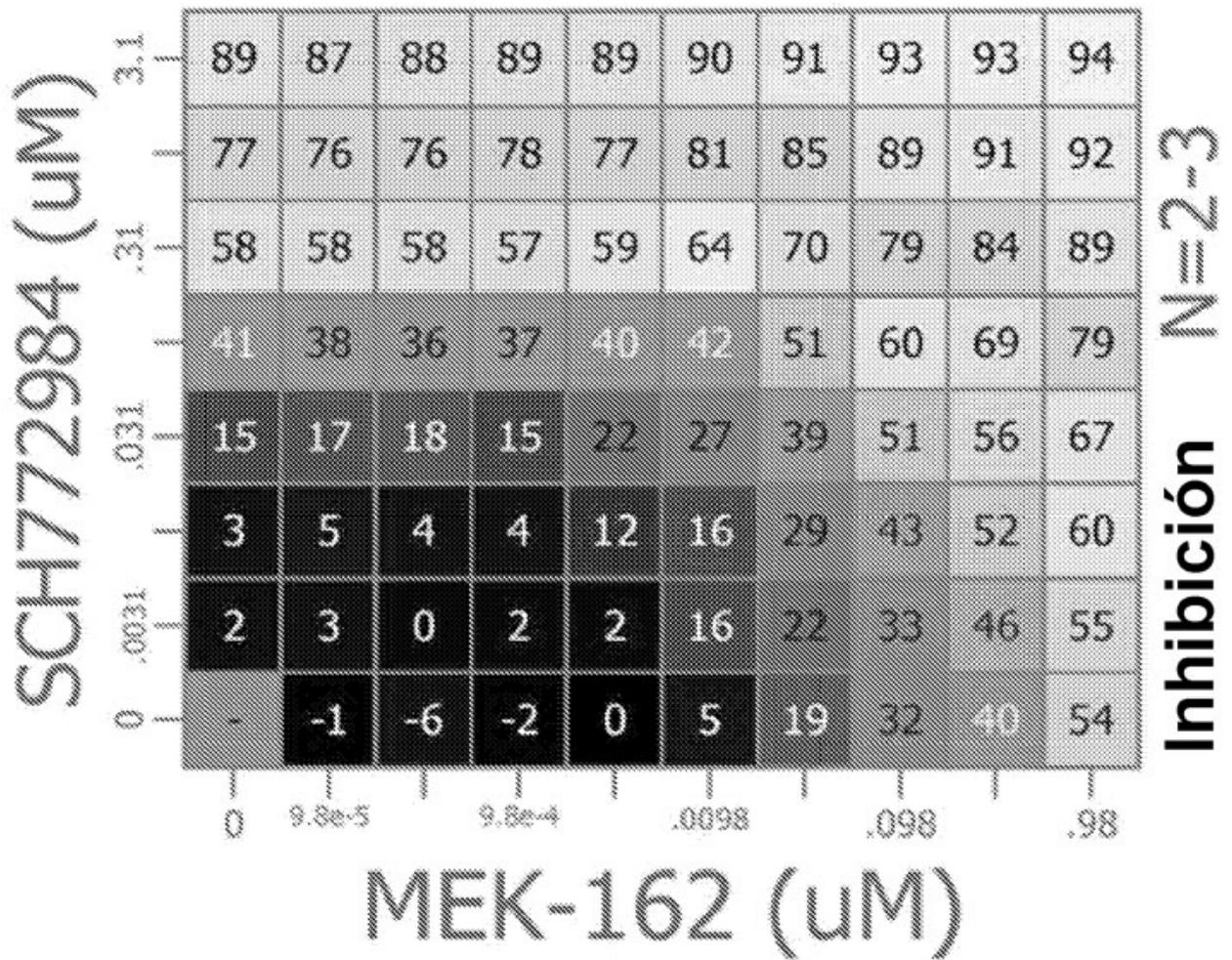
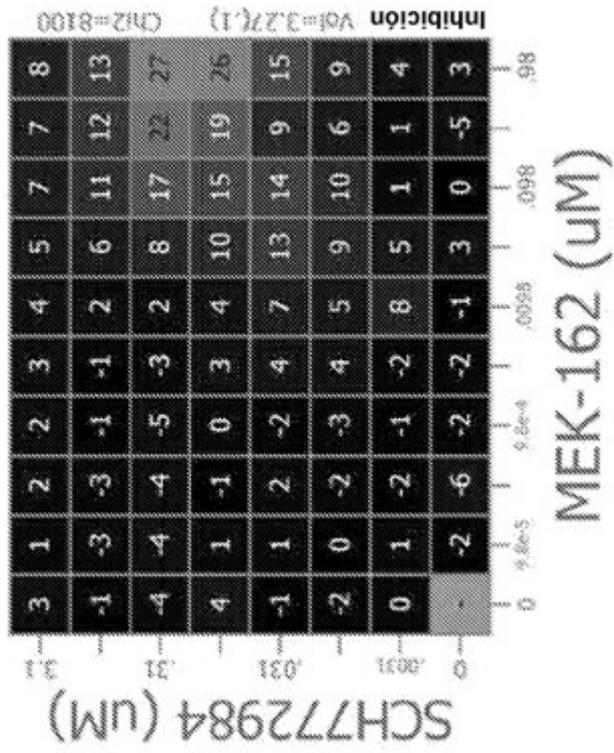


FIG. 32, Cont.

E



F

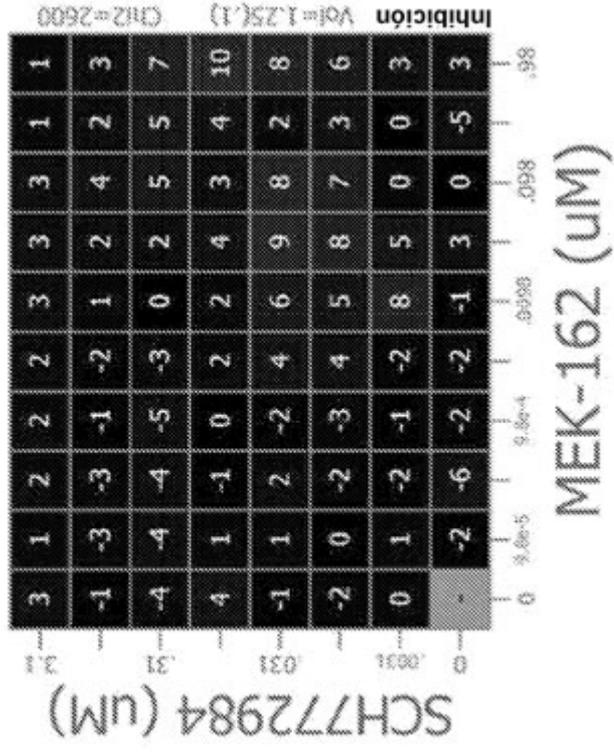


FIG. 32, Cont.

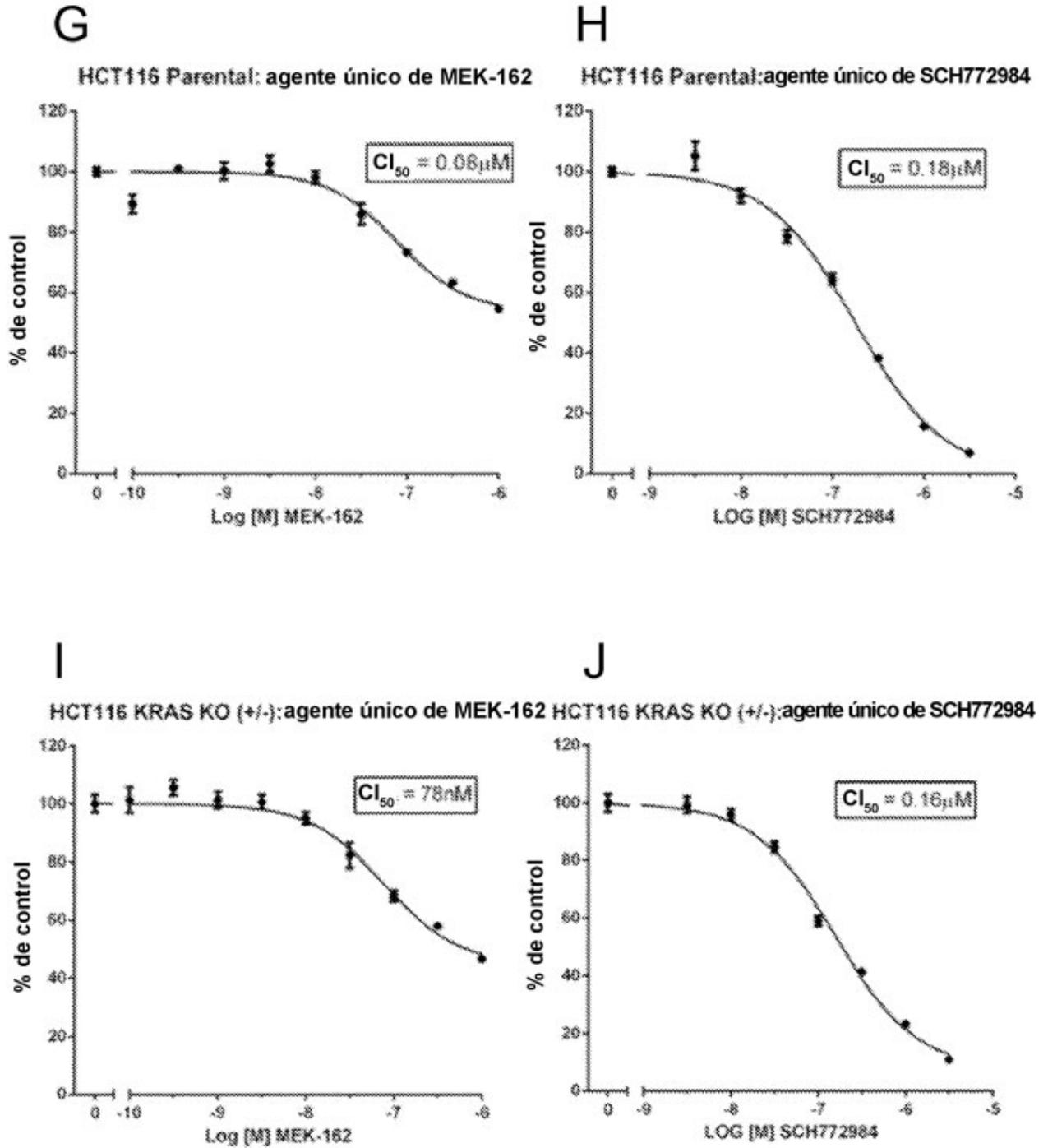


FIG. 33

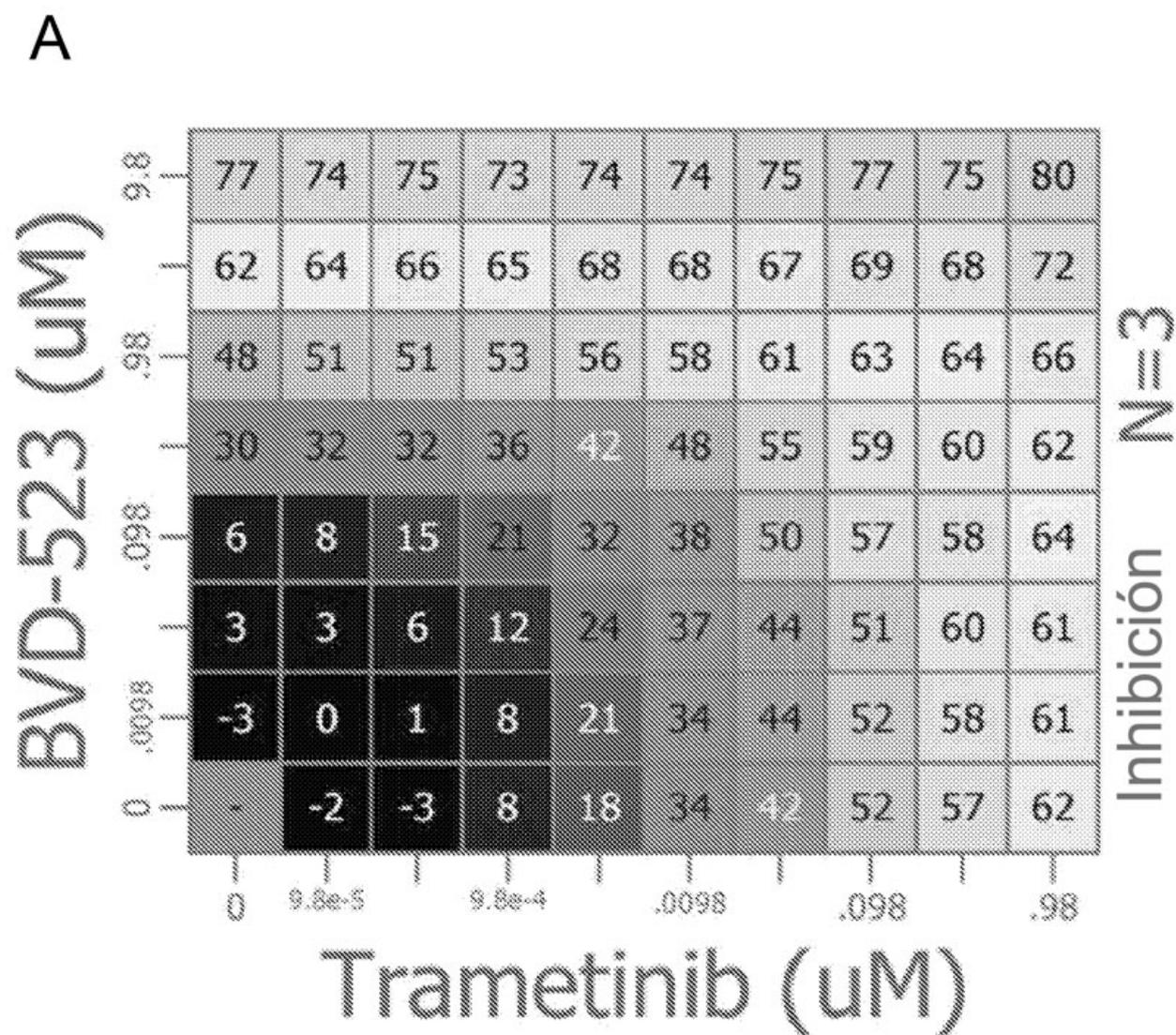
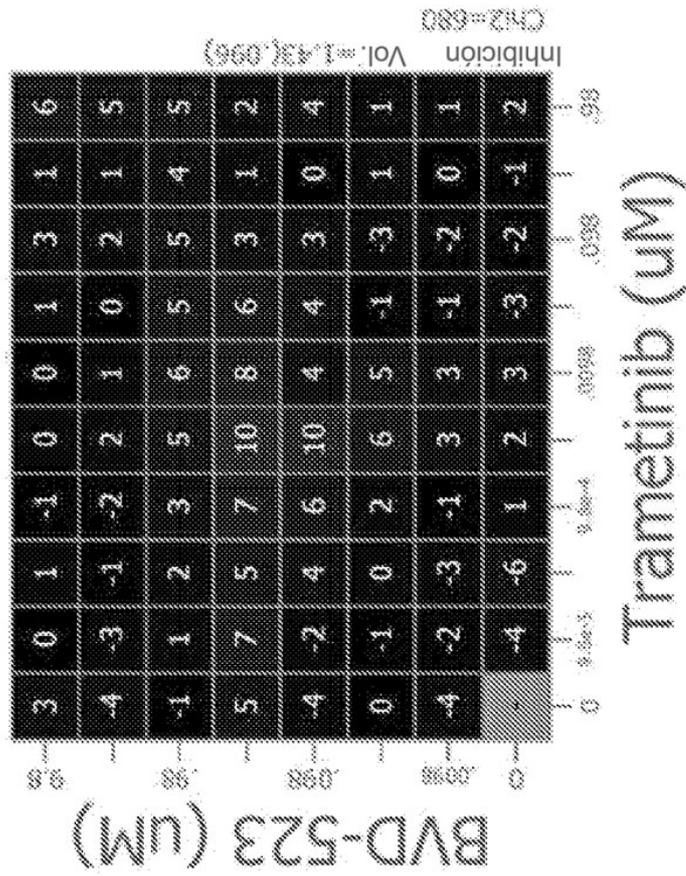


FIG. 33, Cont.

B



C

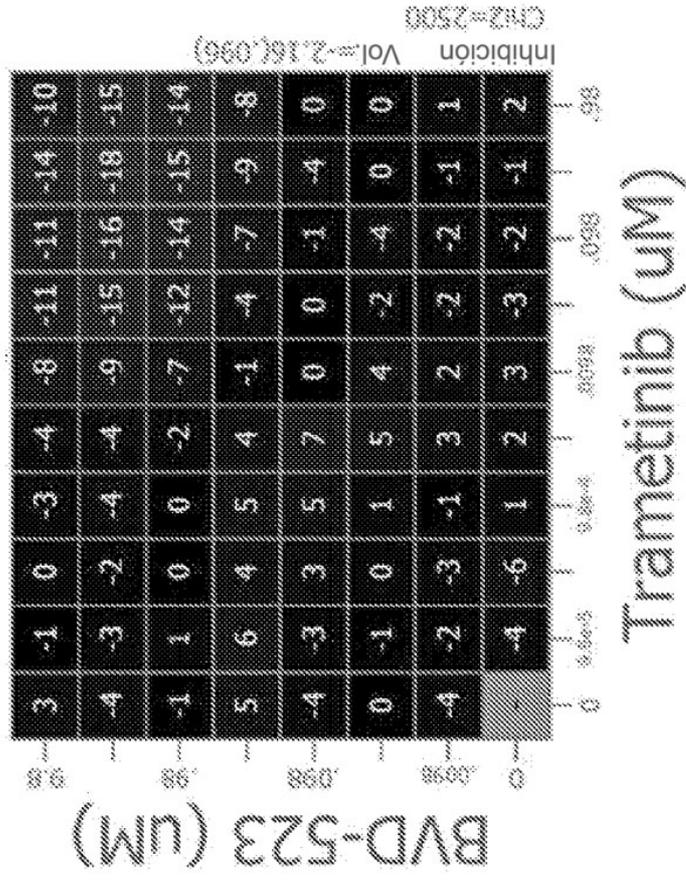


FIG. 33, Cont.

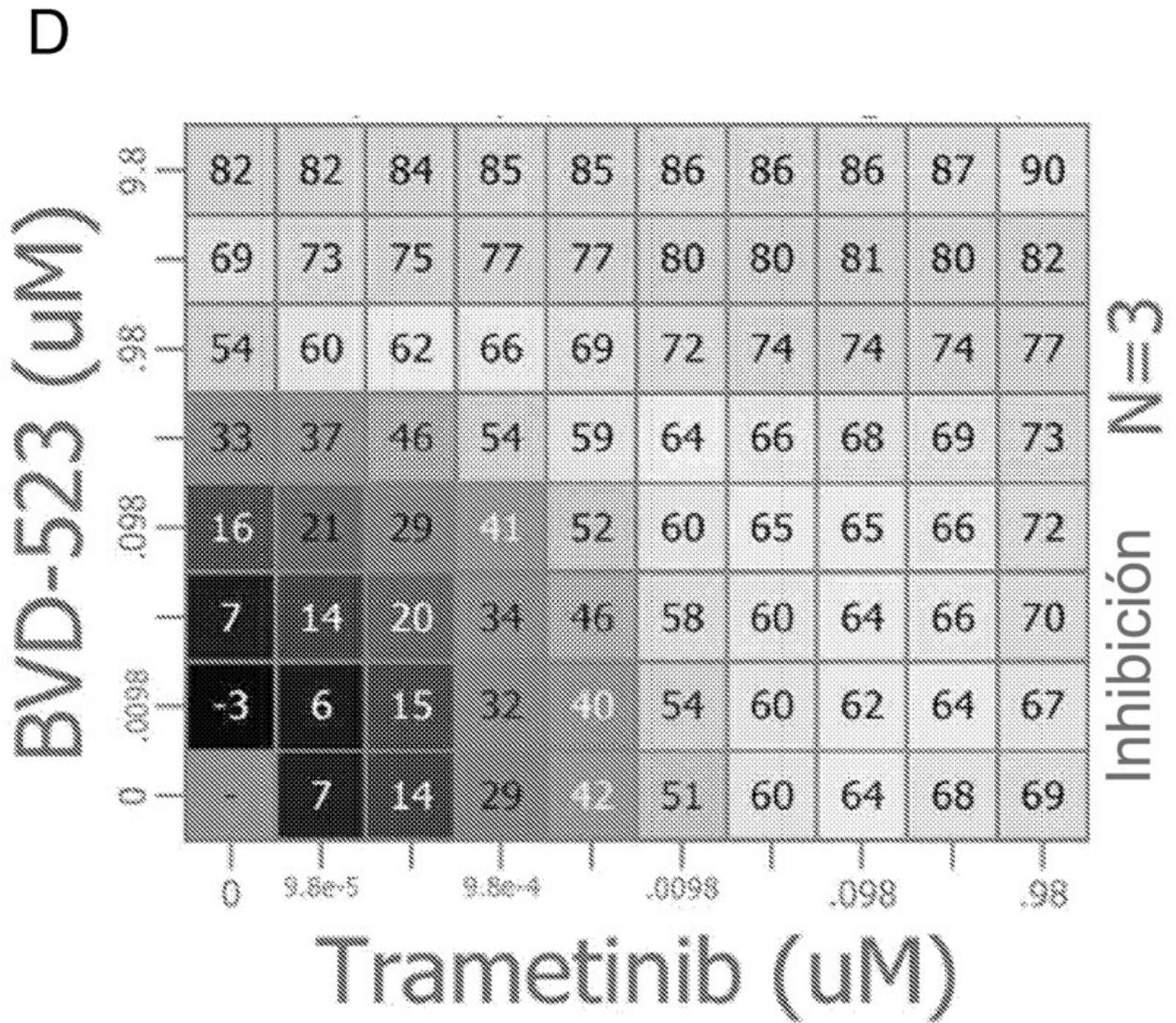
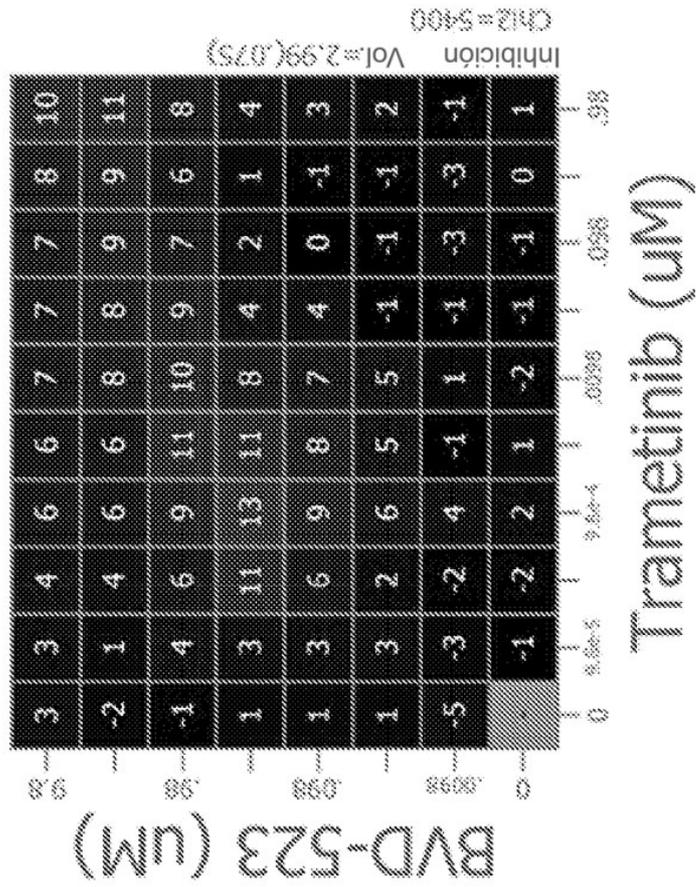


FIG. 33, Cont.

E



F

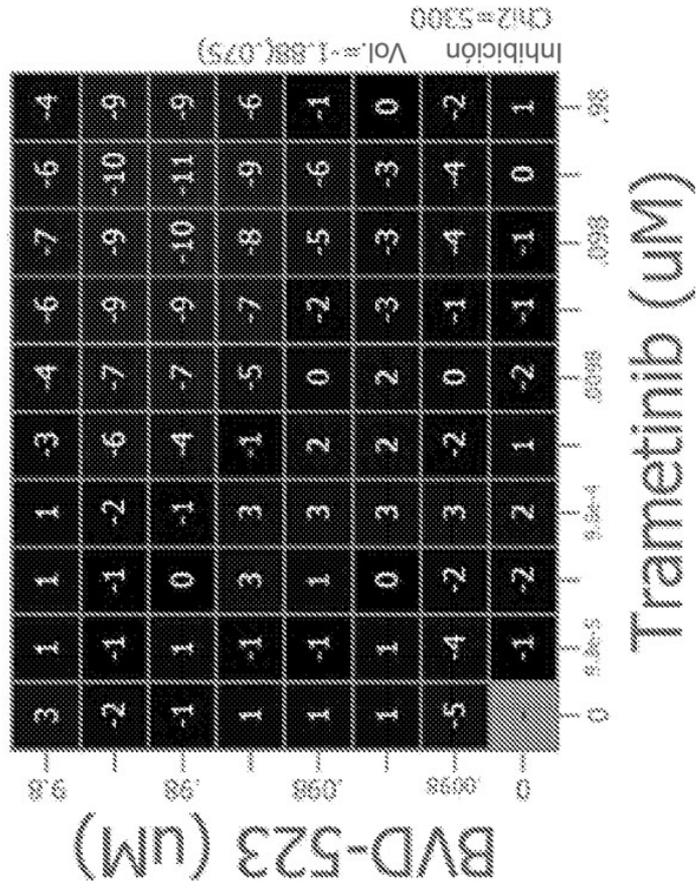


FIG. 33, Cont.

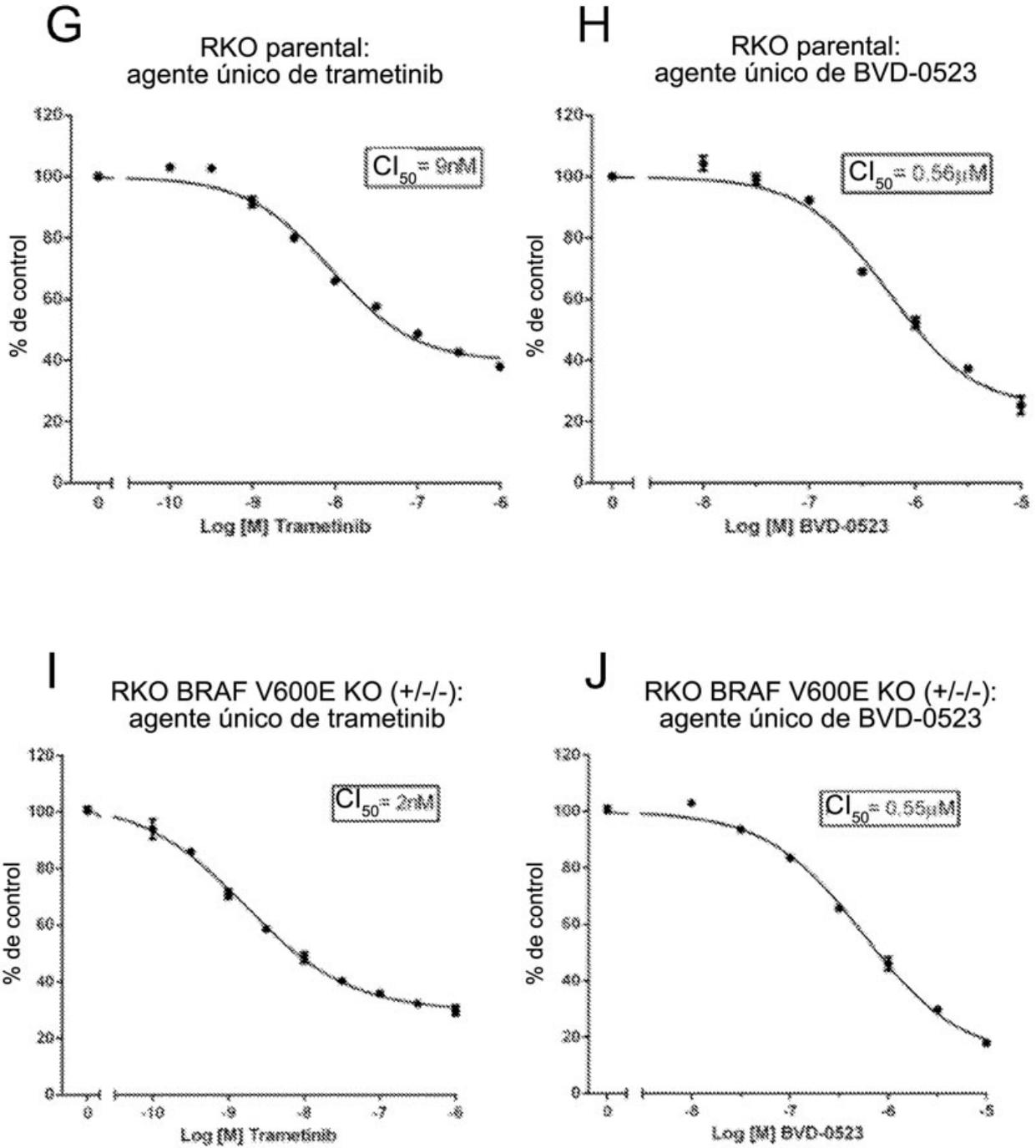


FIG. 34

A

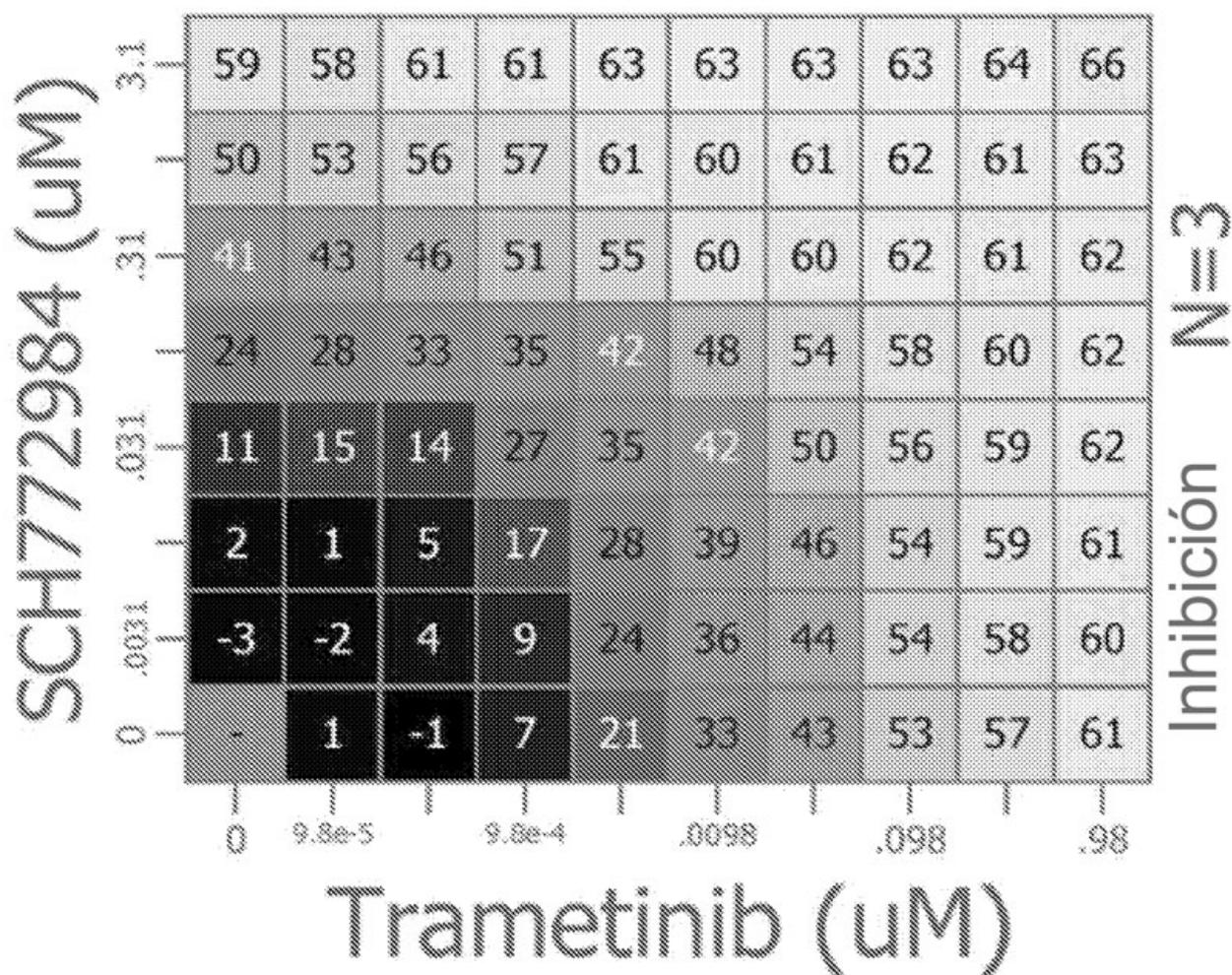
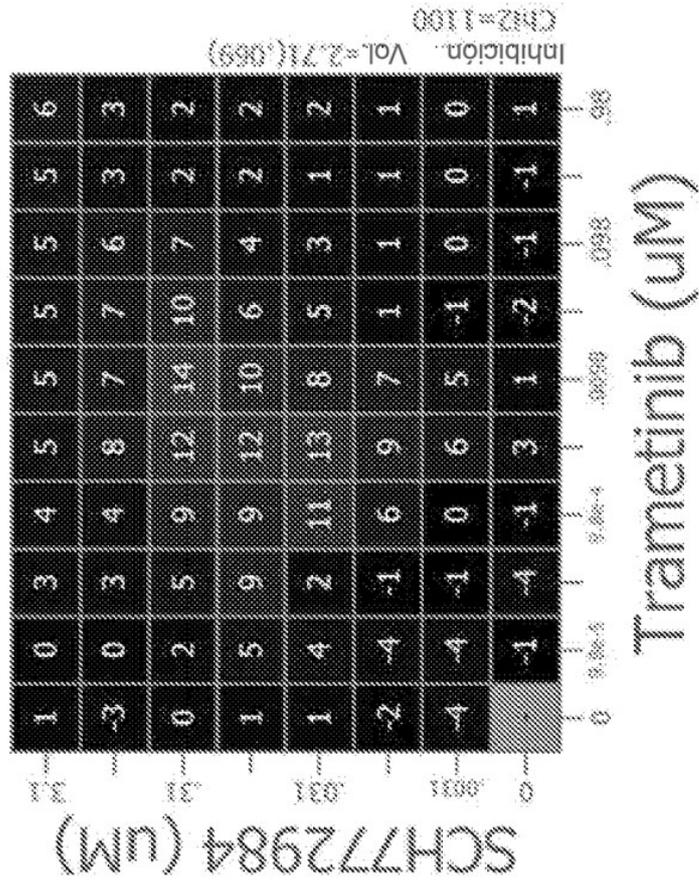


FIG. 34, Cont.

**B**



**C**

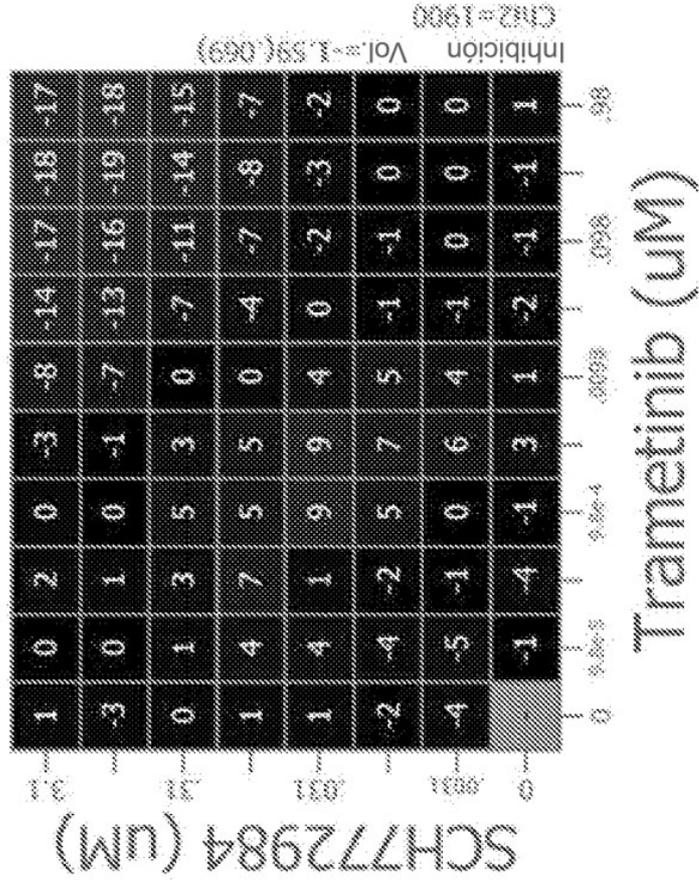


FIG. 34, Cont.

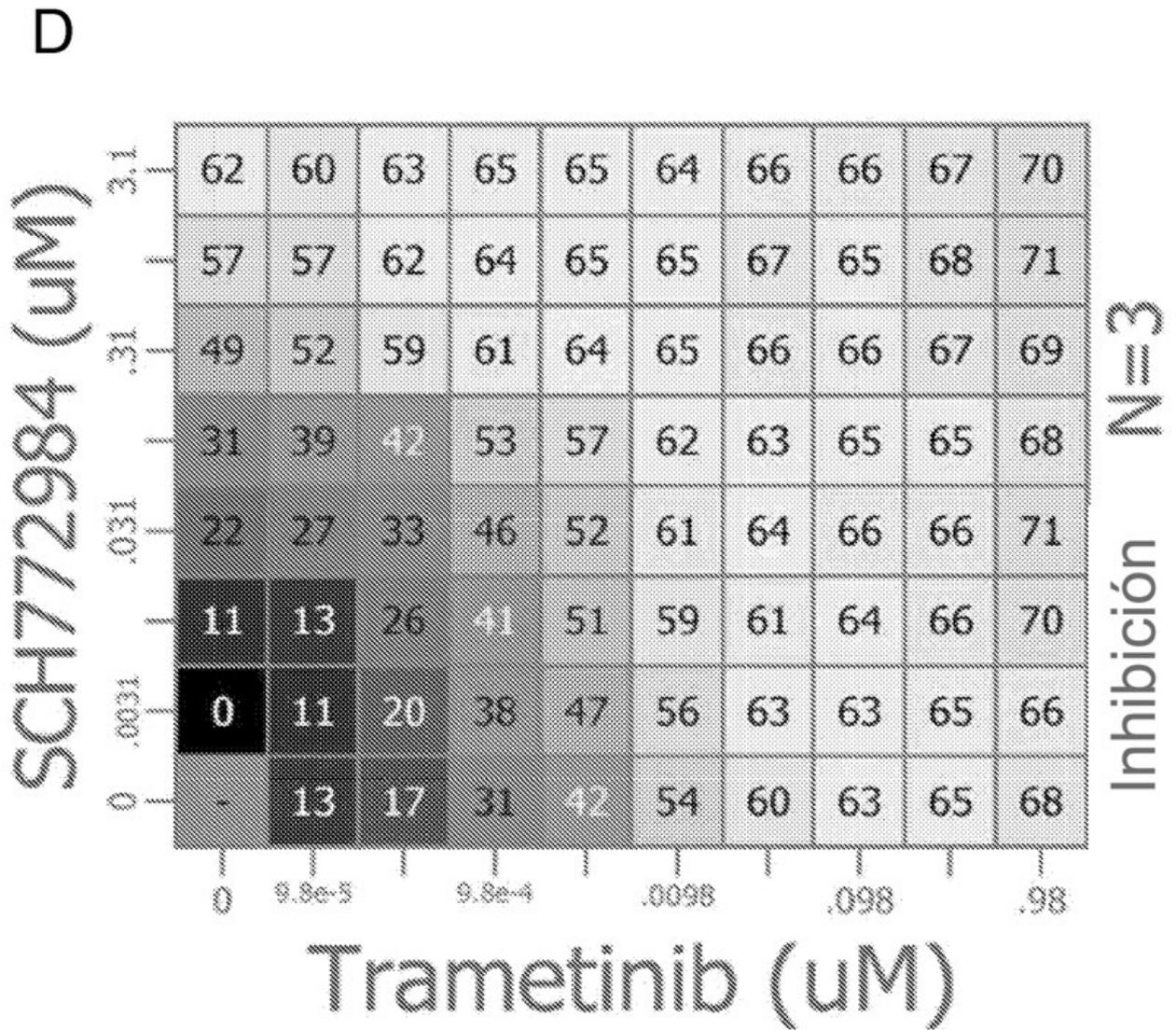
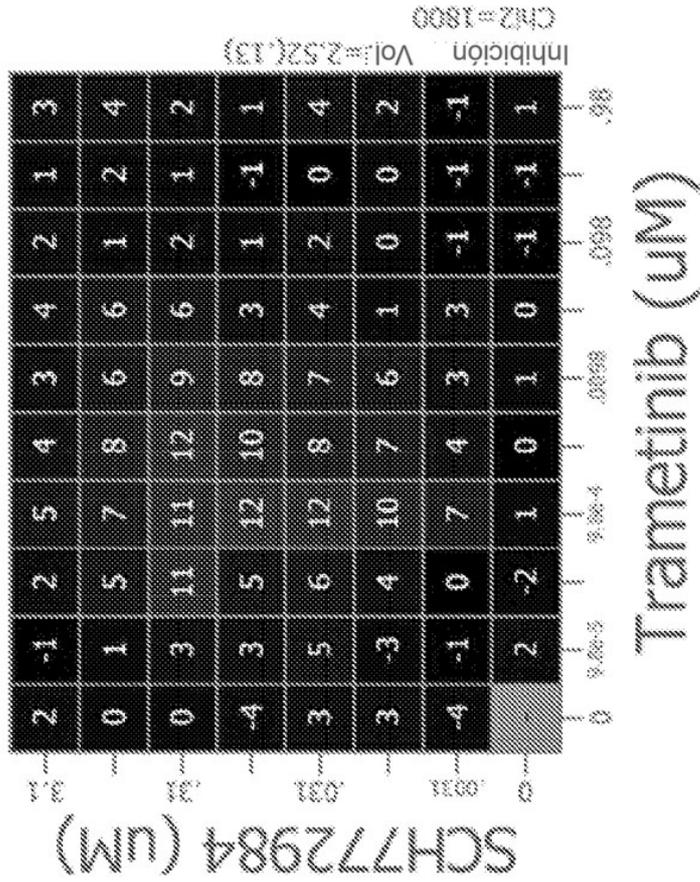


FIG. 34, Cont.

E



F

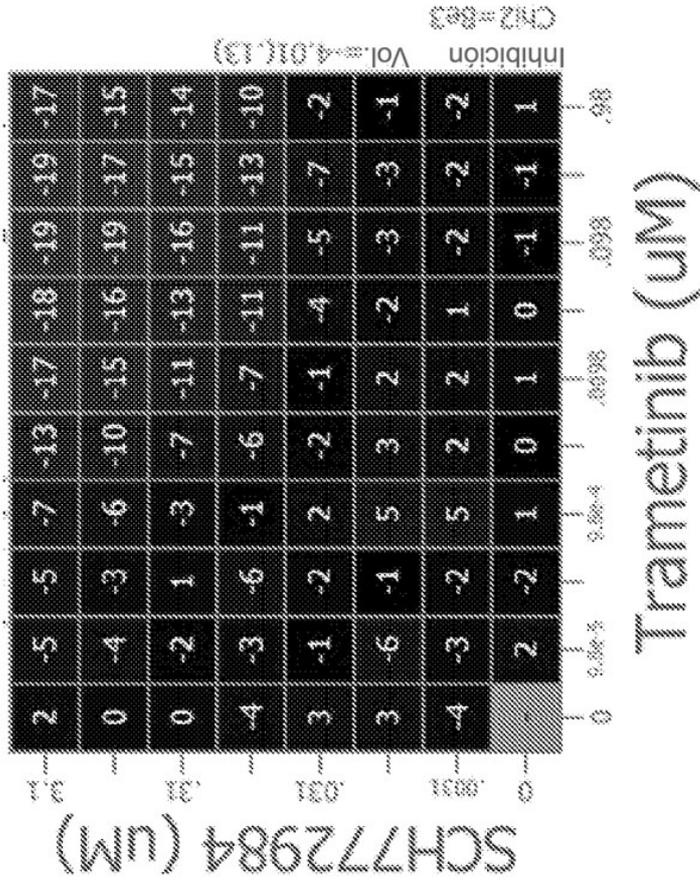


FIG. 34, Cont.

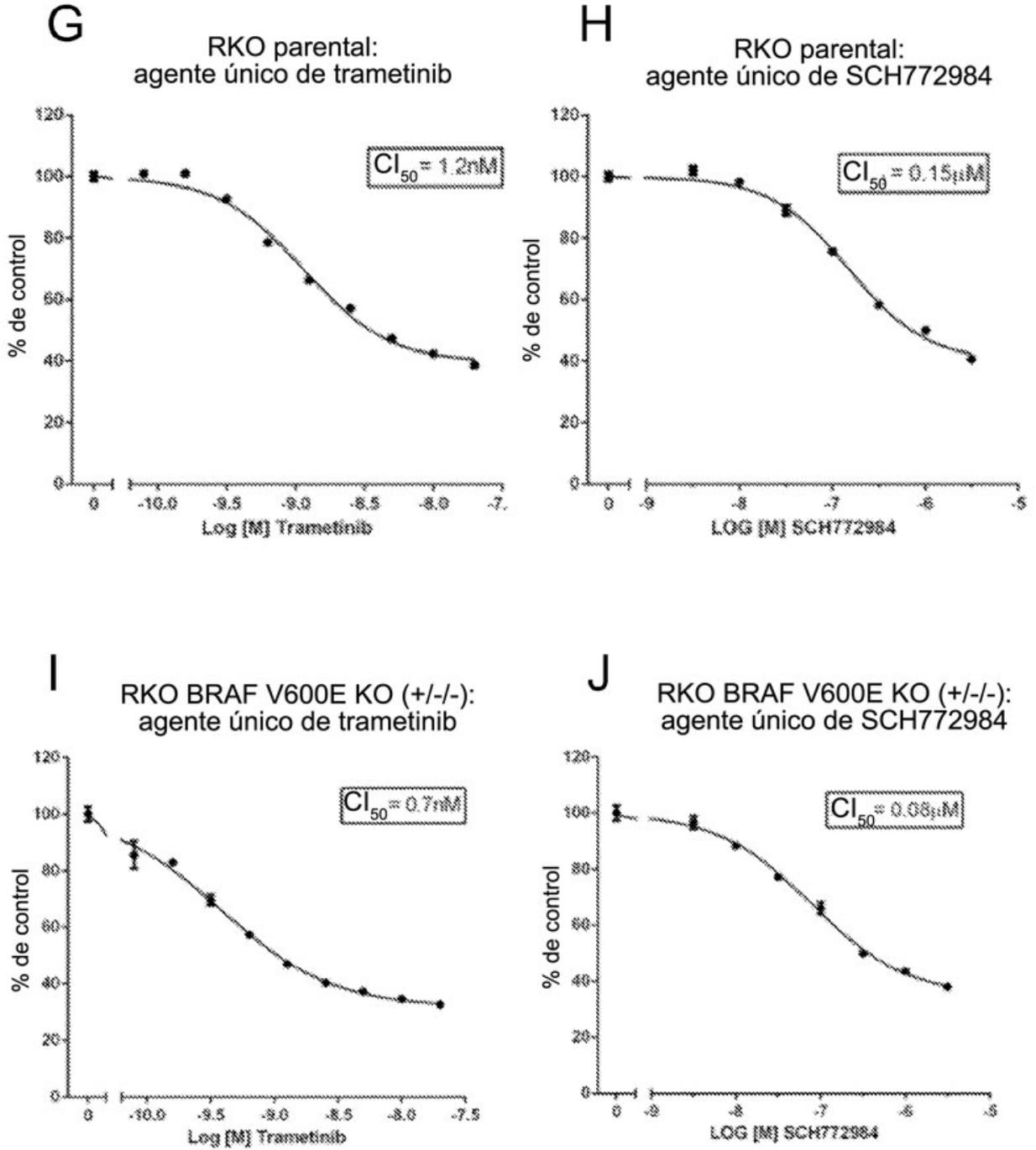


FIG. 35

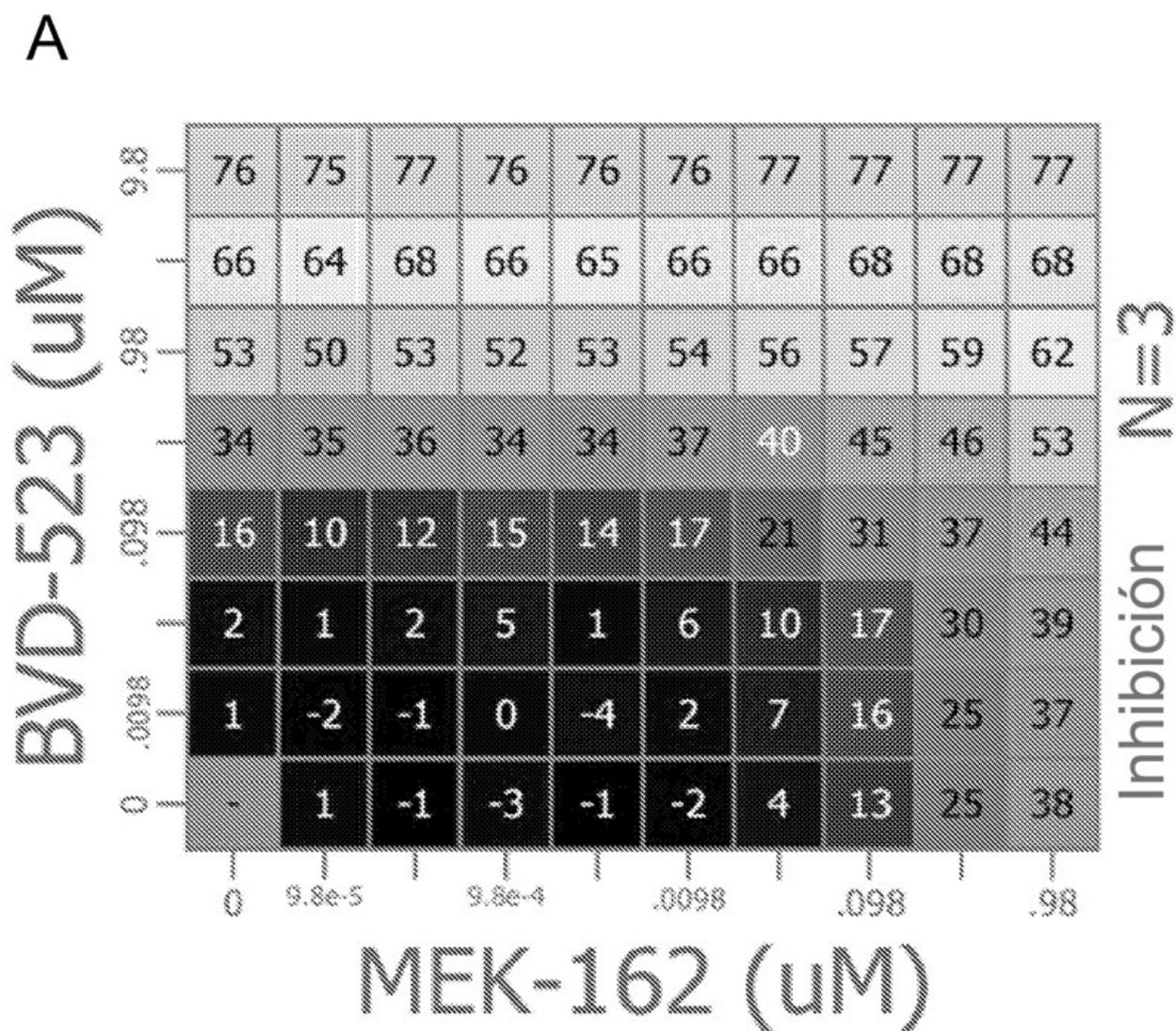
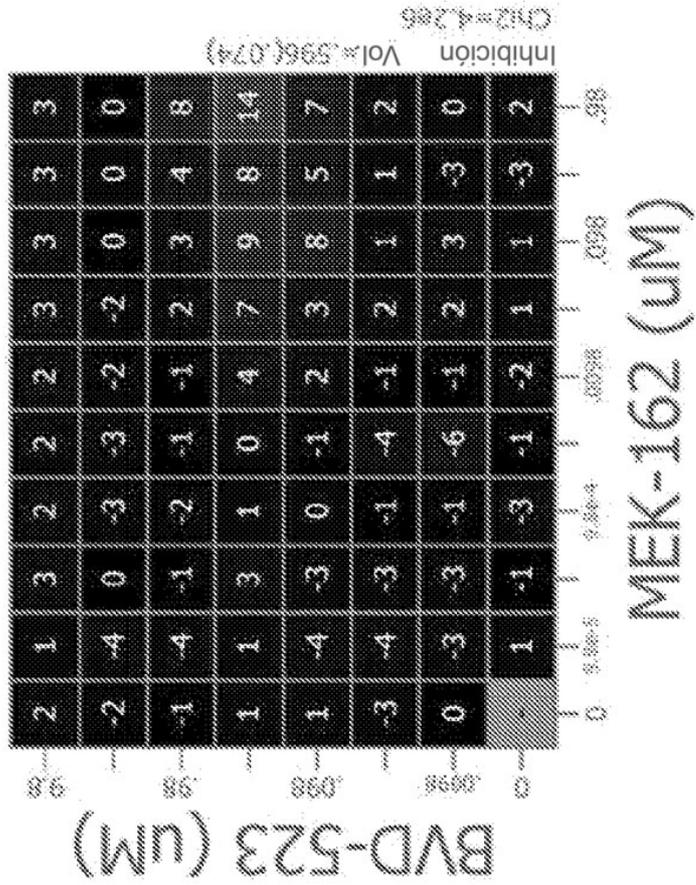


FIG. 35, Cont.

B



C

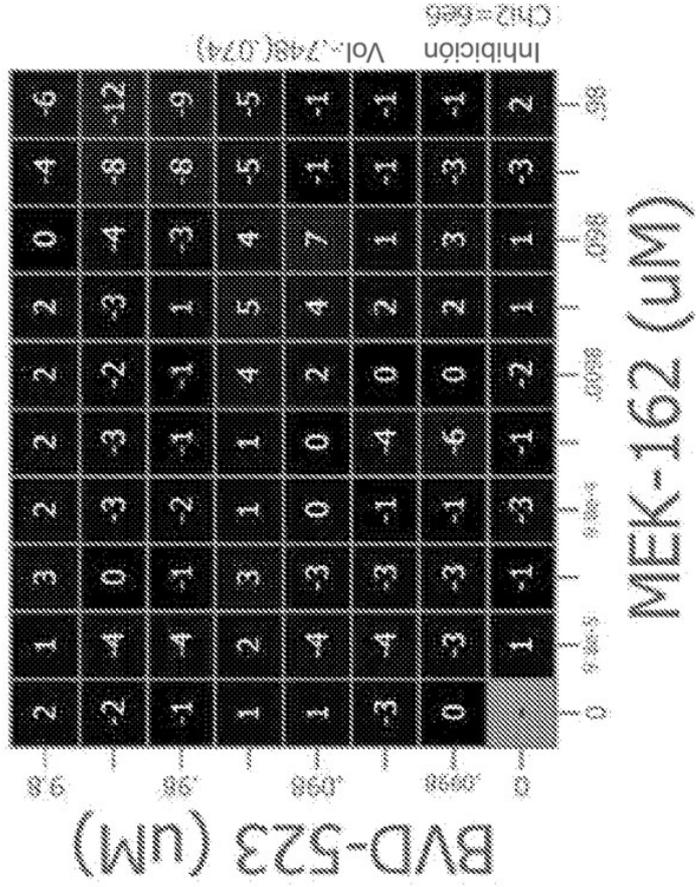


FIG. 35, Cont.

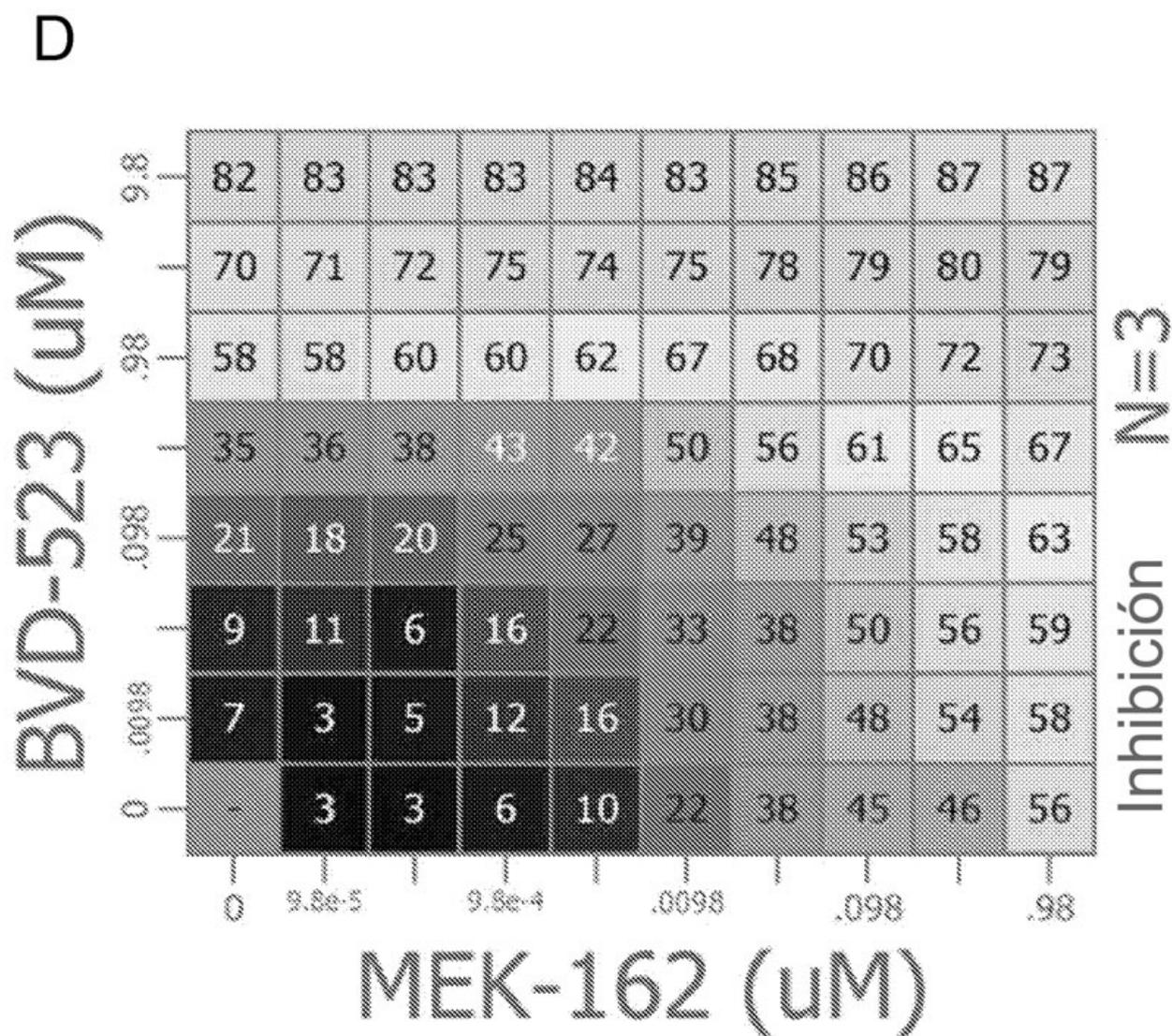
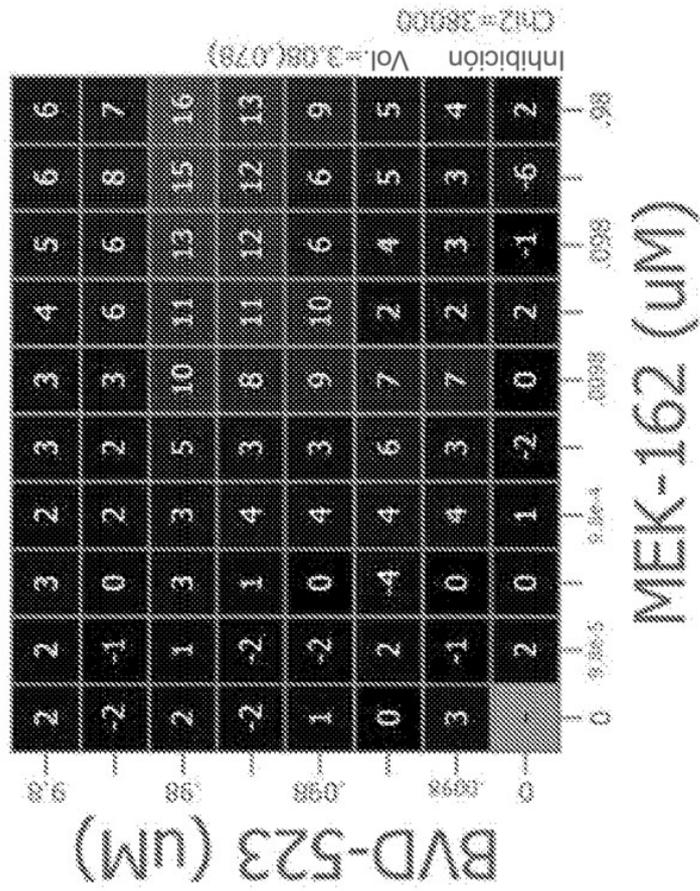


FIG. 35, Cont.

E



F

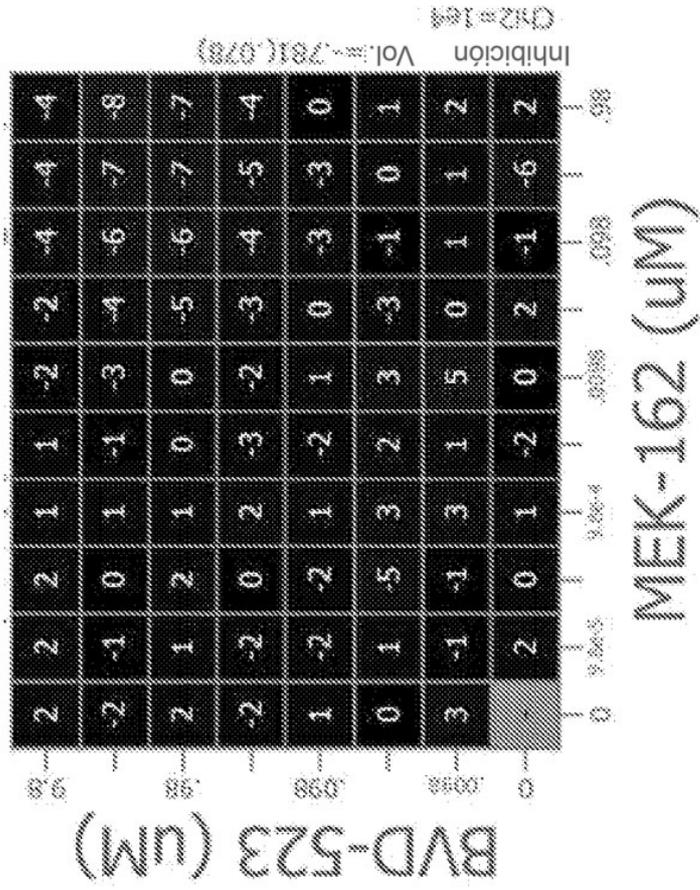


FIG. 35, Cont.

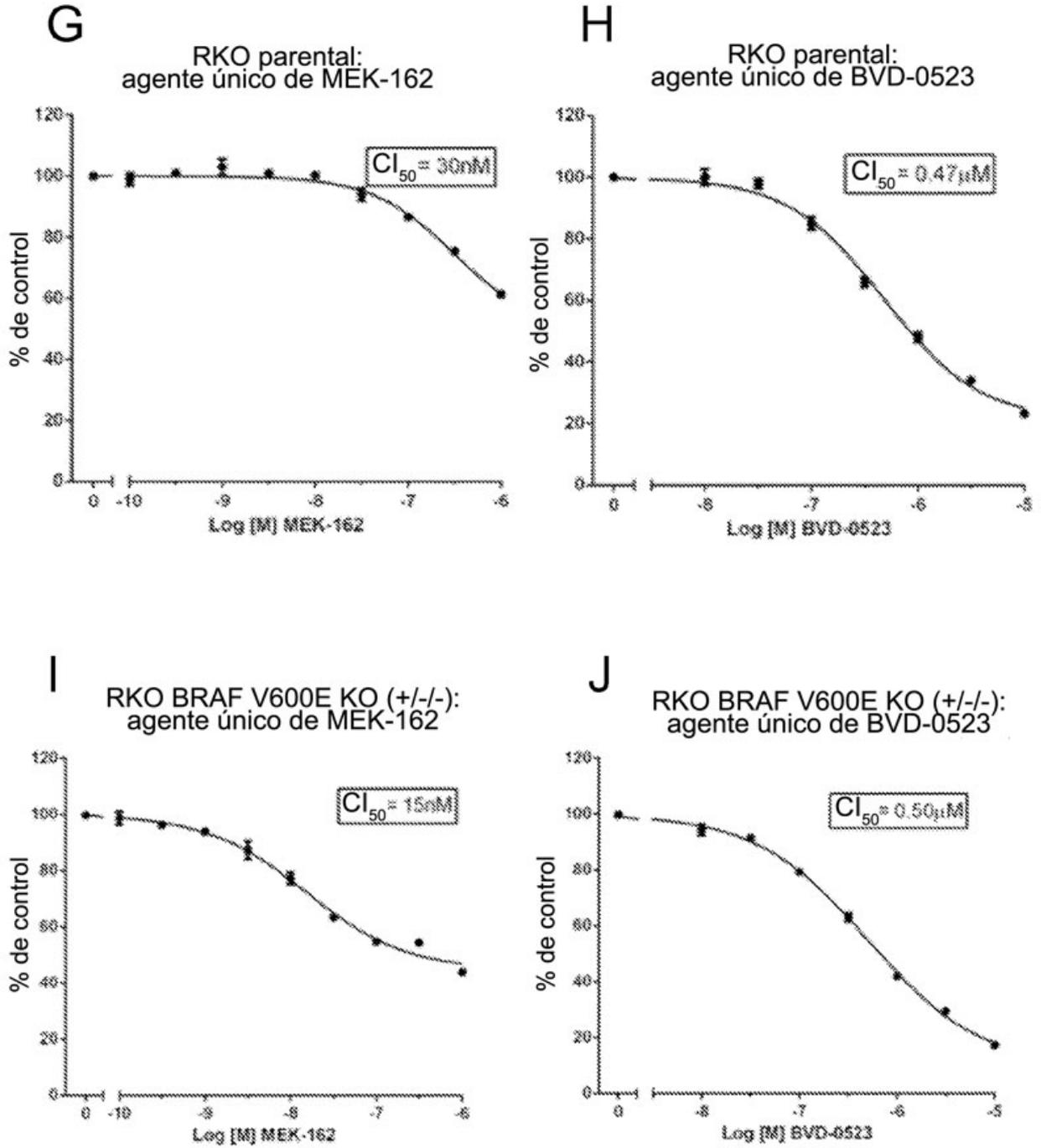


FIG. 36

A

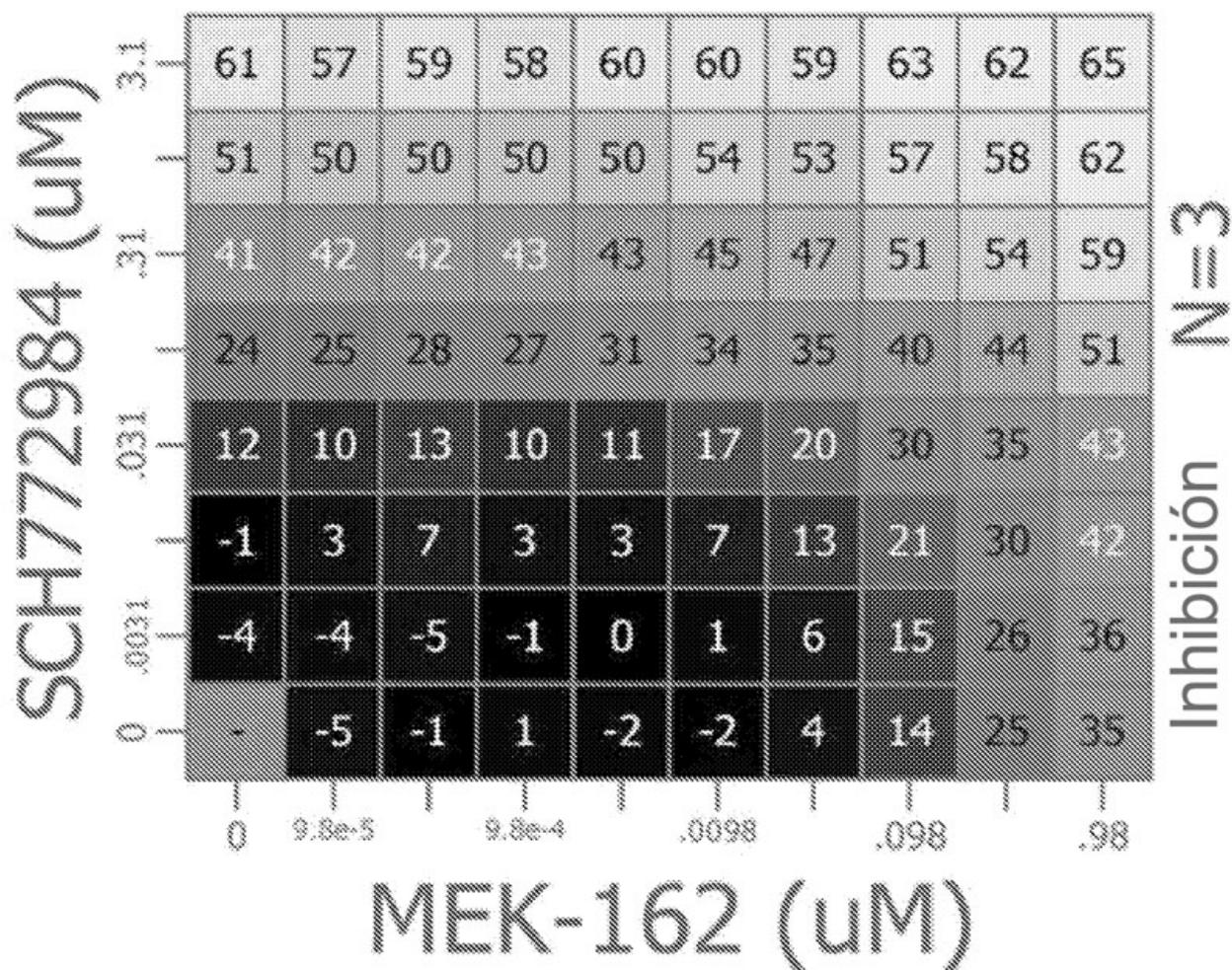
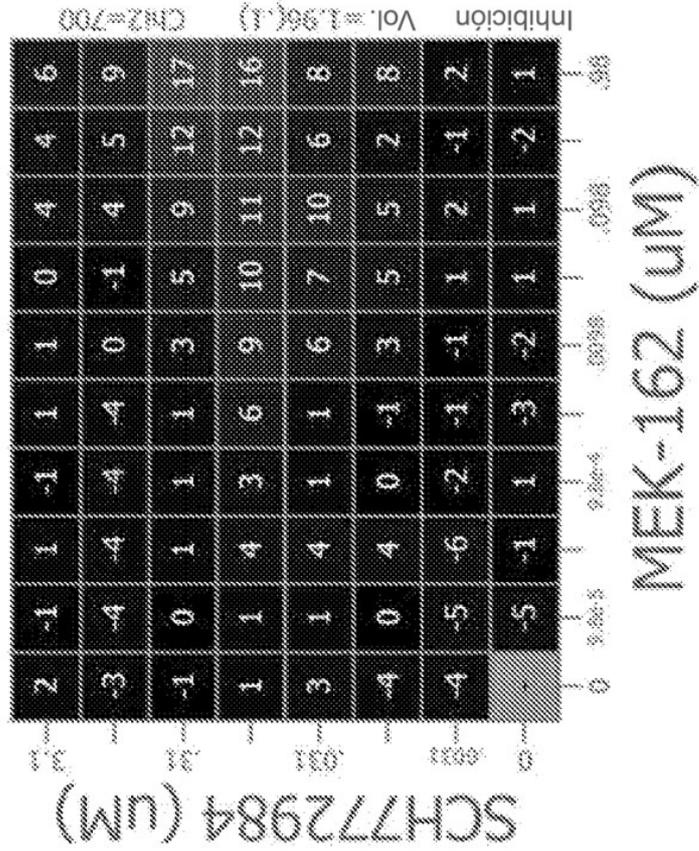


FIG. 36, Cont.

B



C

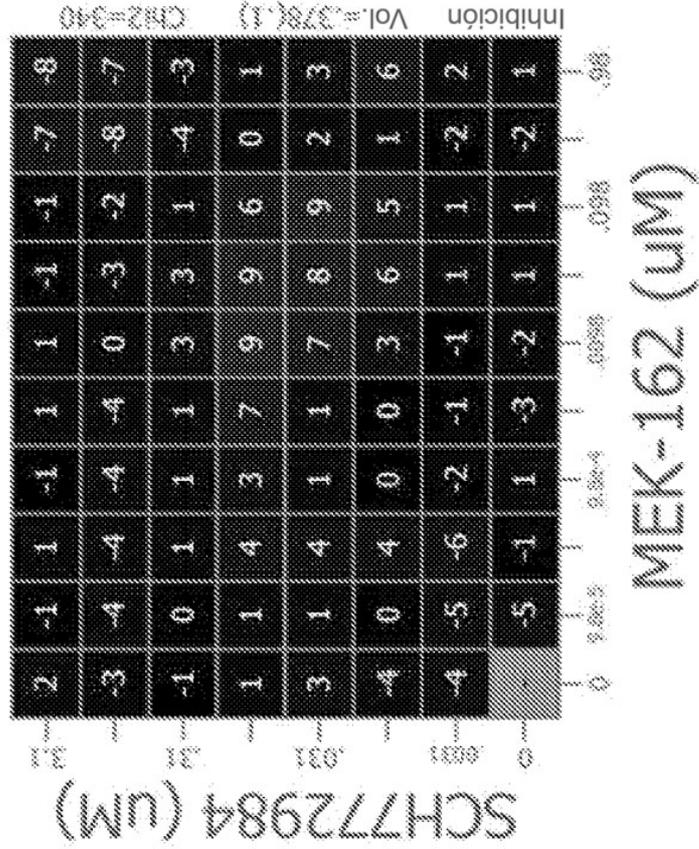


FIG. 36, Cont.

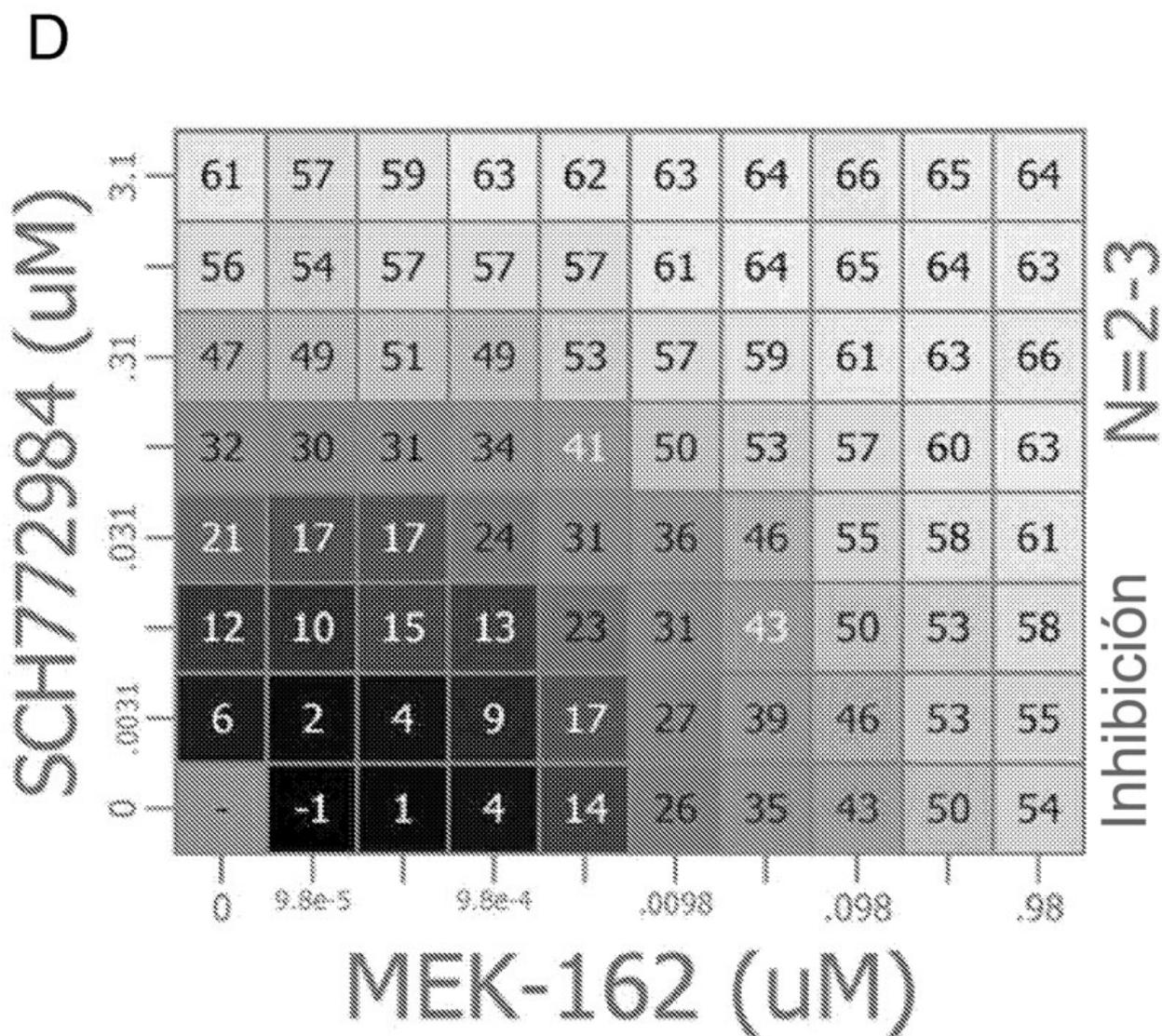
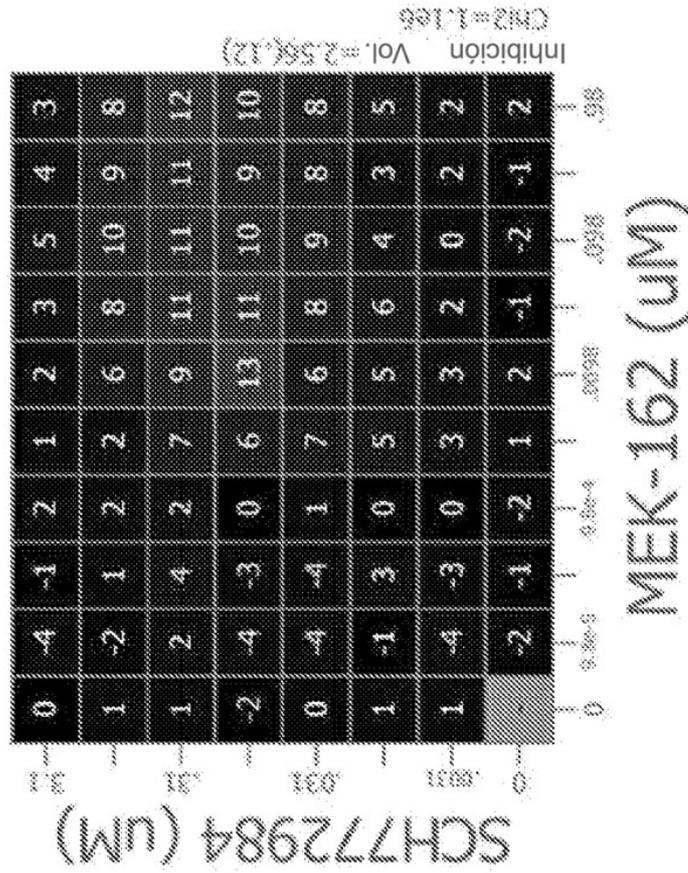


FIG. 36, Cont.

E



F

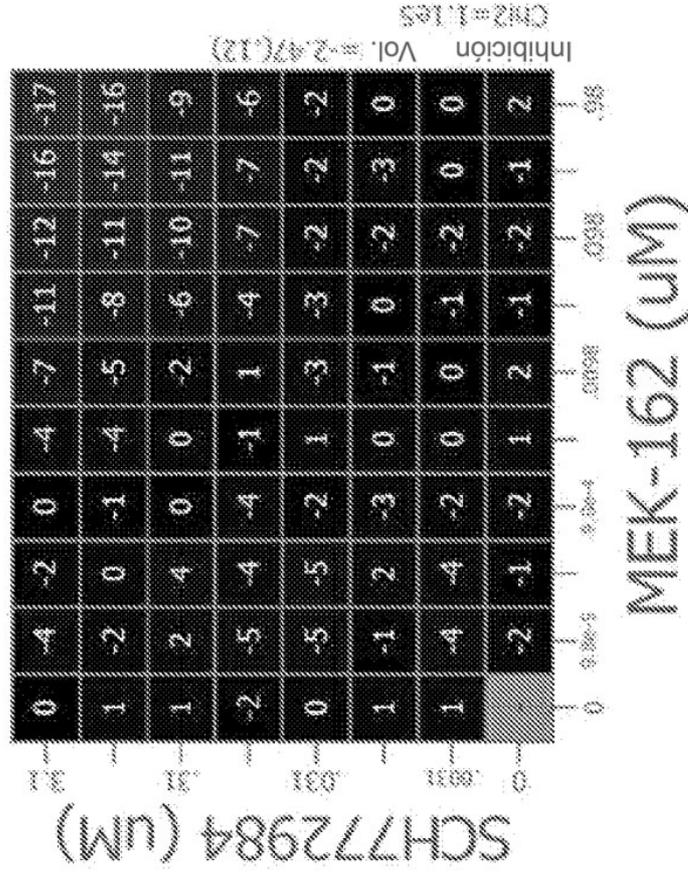


FIG. 36, Cont.

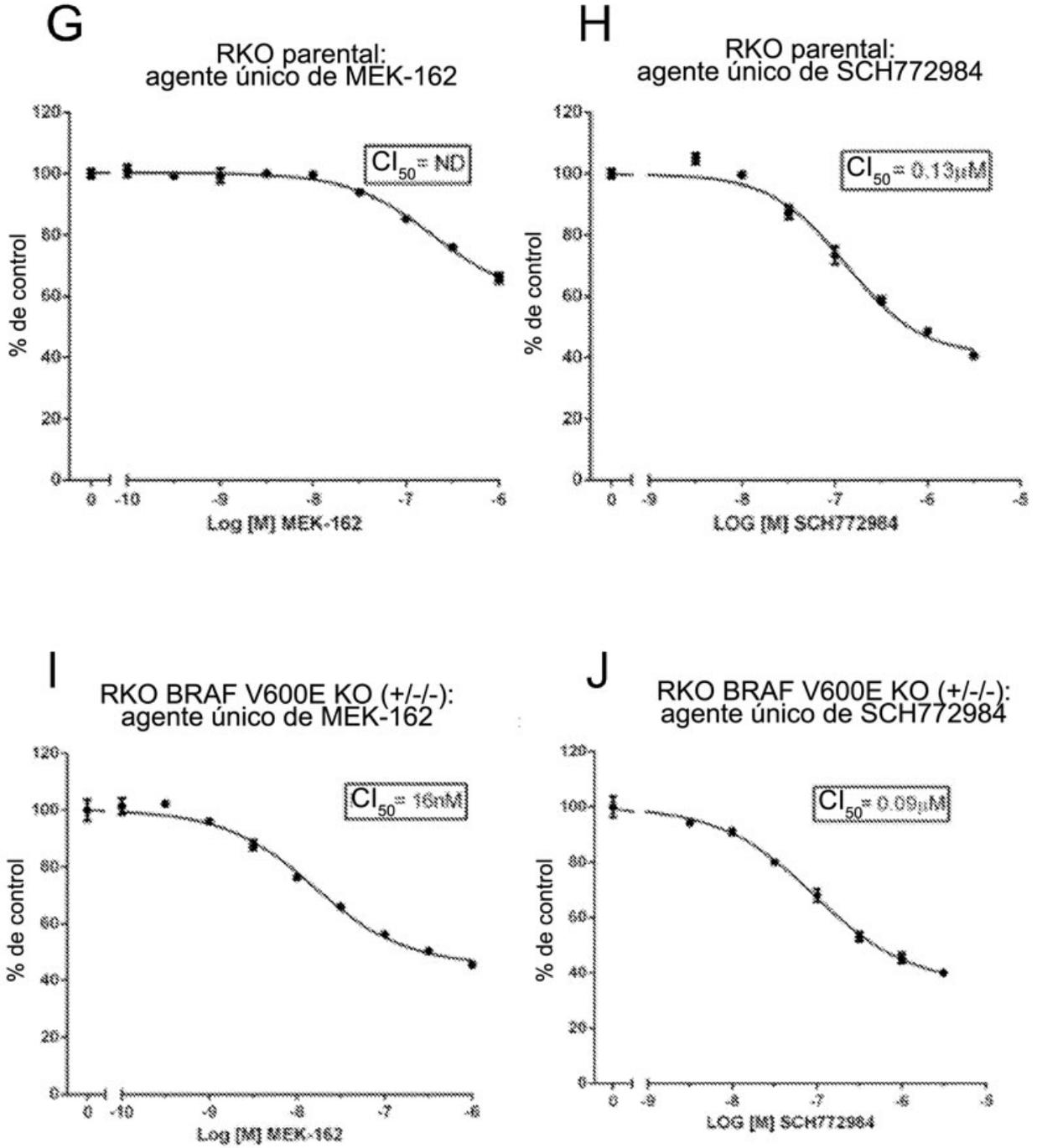


FIG. 37

A

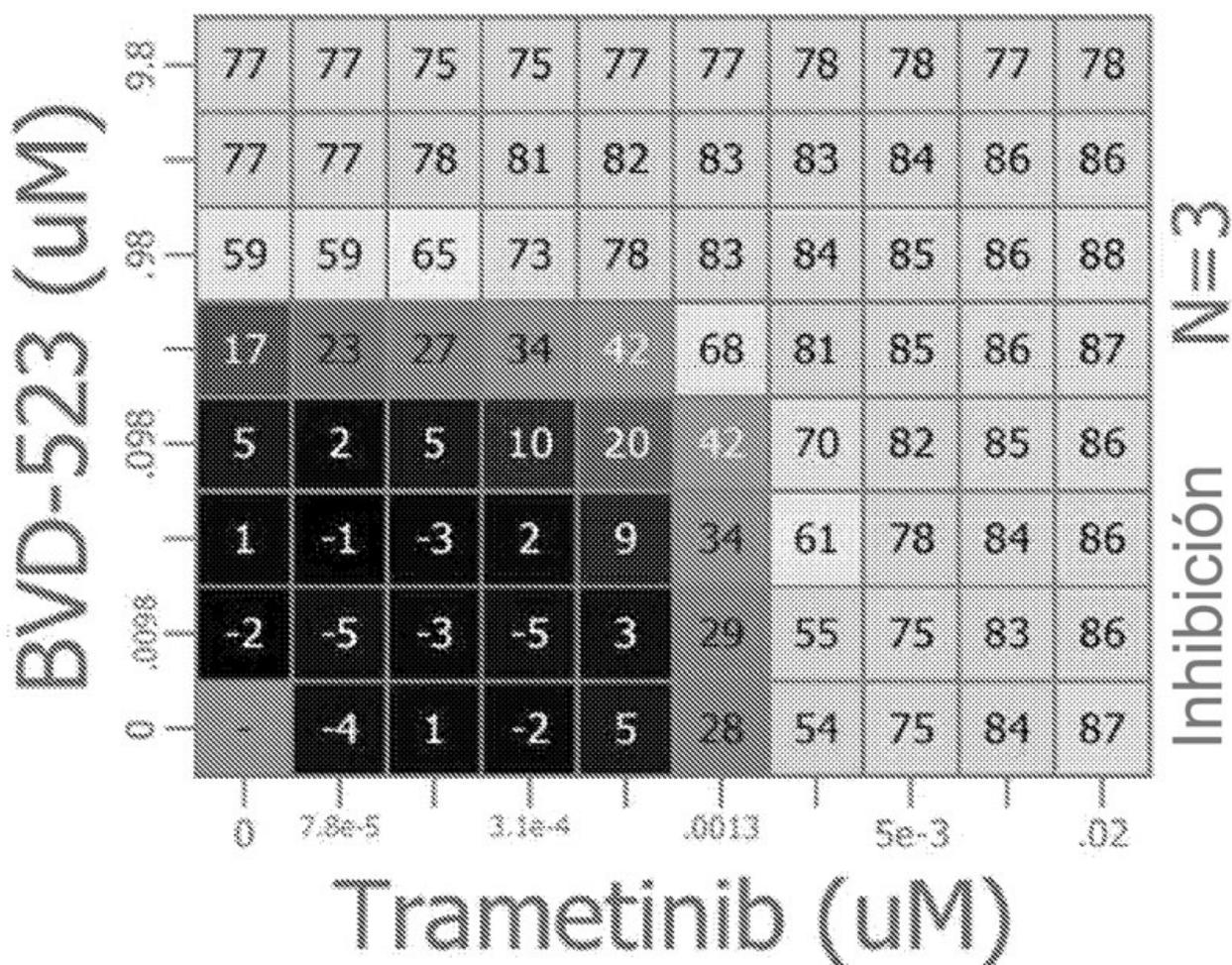
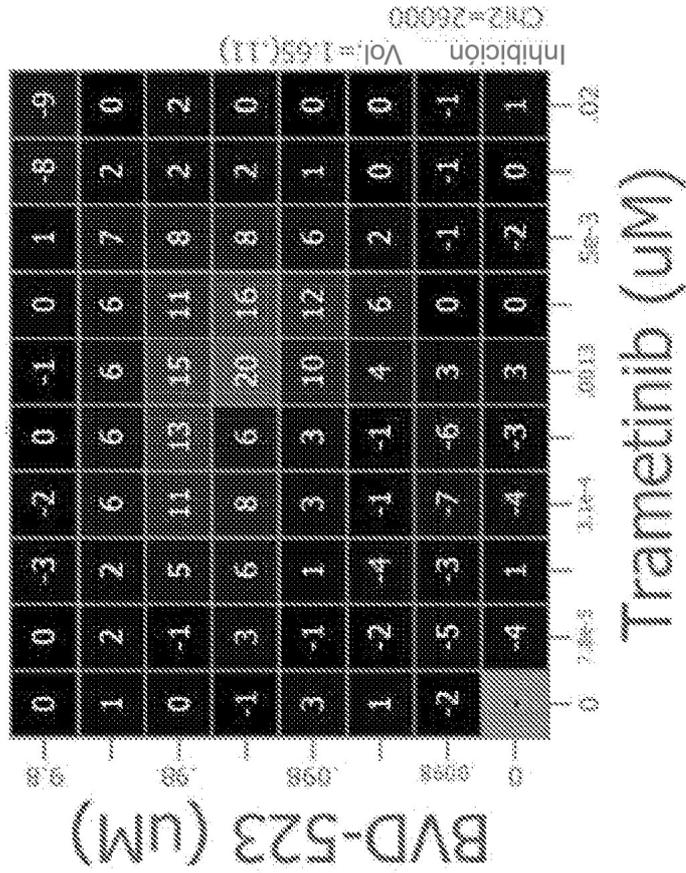


FIG. 37, Cont.

B



C

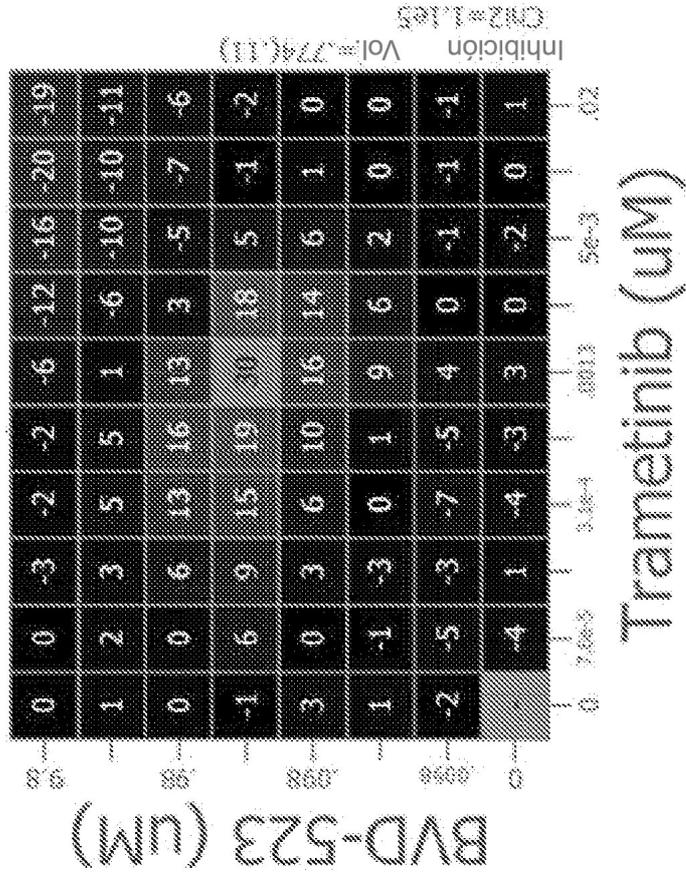
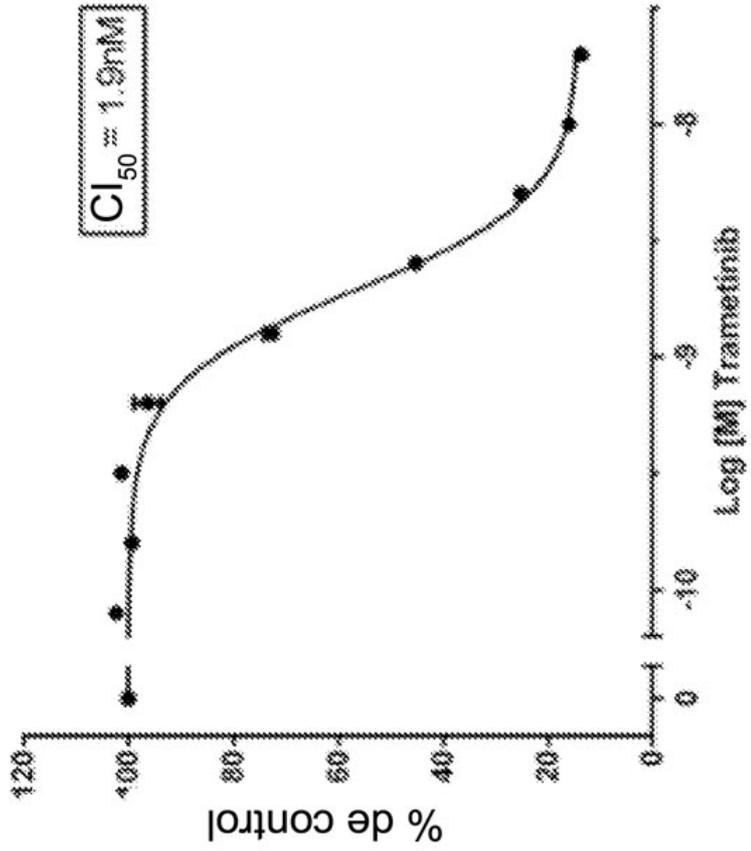


FIG. 37, Cont.

D

G-361: agente único de trametinib



E

G-361: agente único de BVD-0523

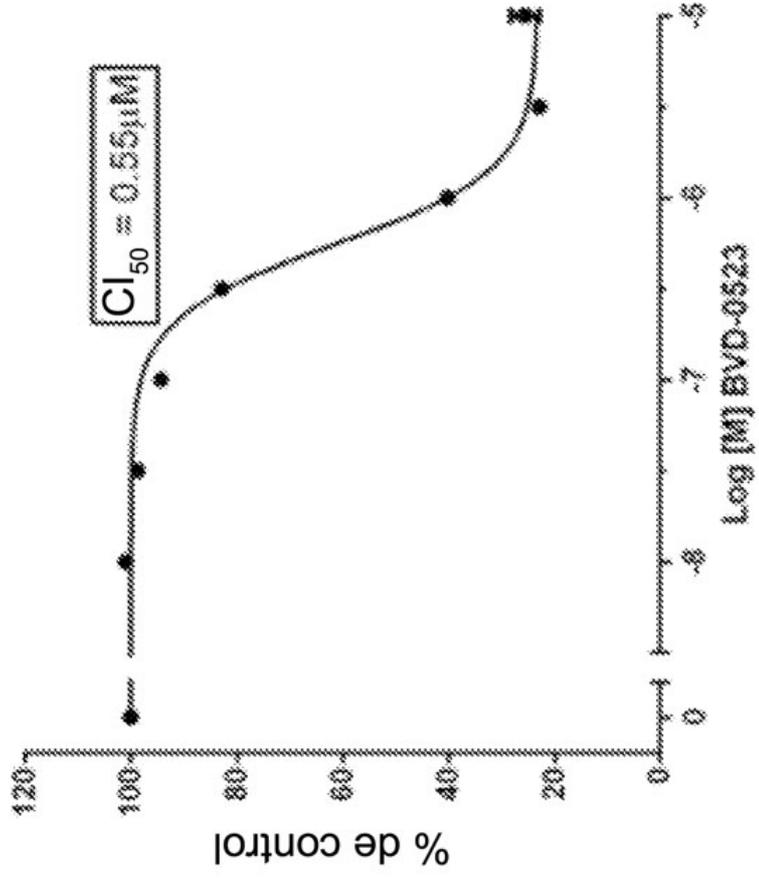


FIG. 38

A

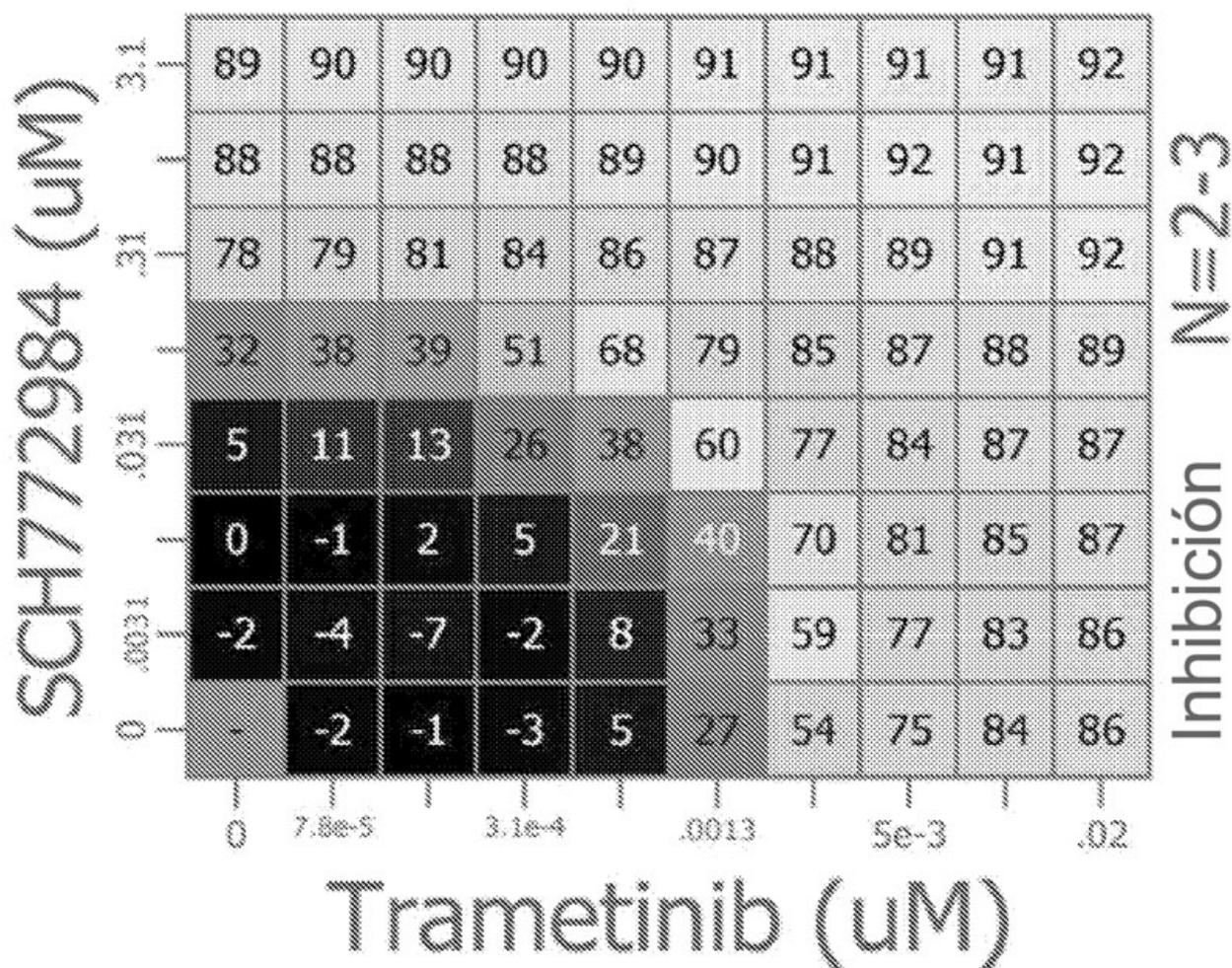
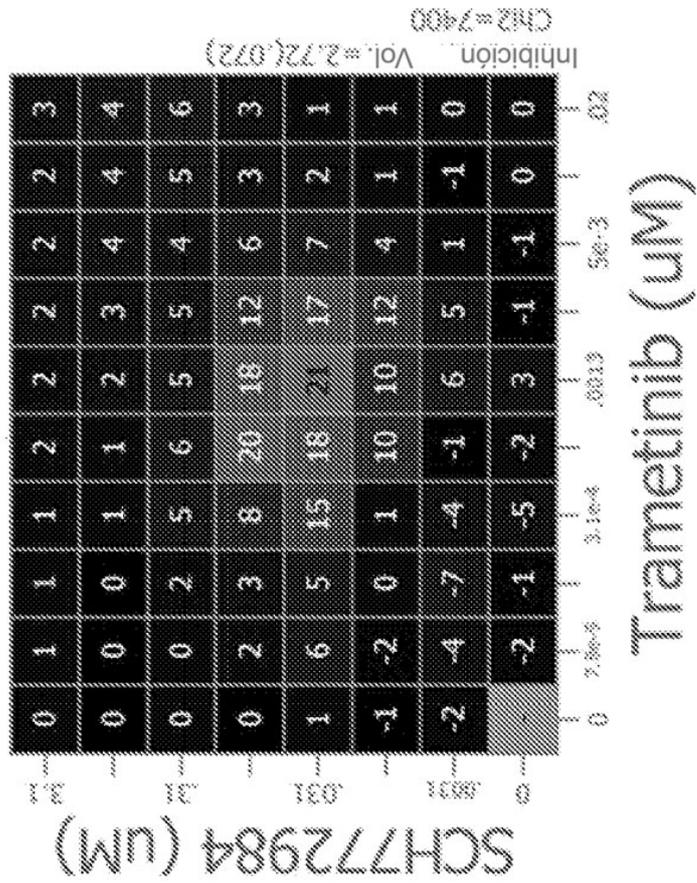


FIG. 38, Cont.

B



C

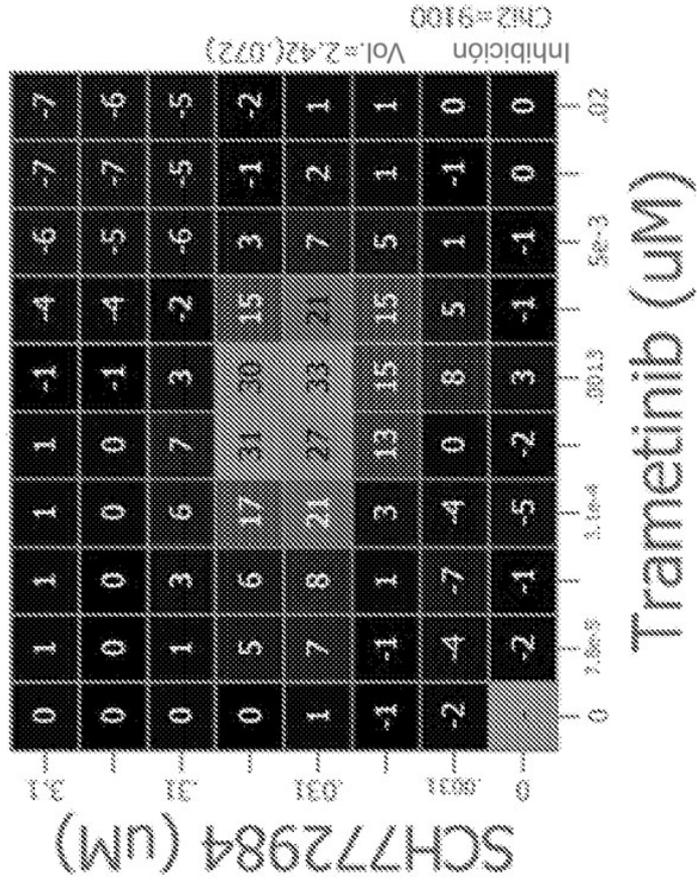
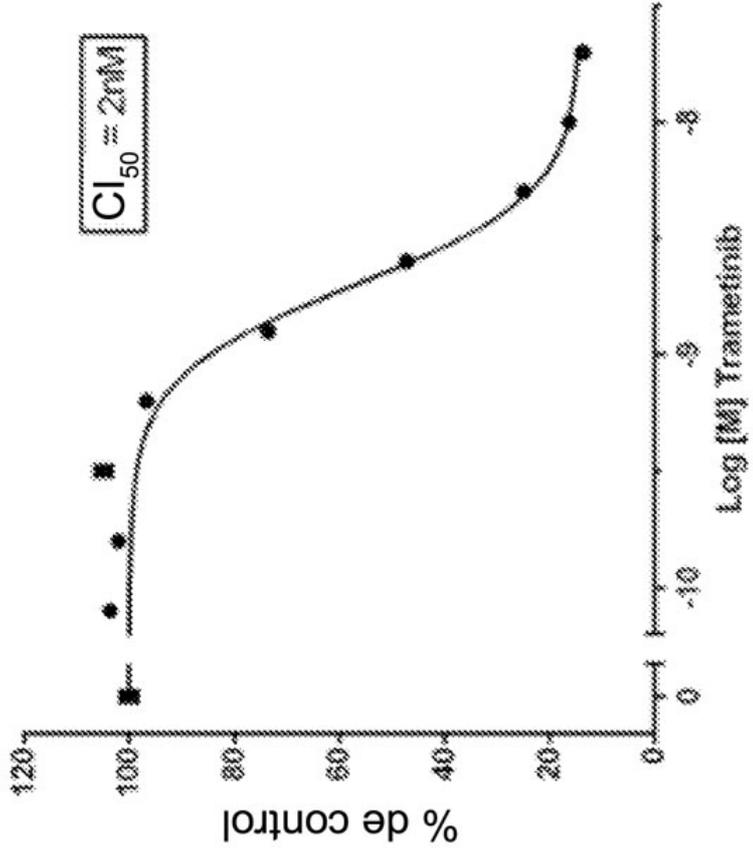


FIG. 38, Cont.

D

G-361: agente único de trametinib



E

G-361: agente único de SCH772984

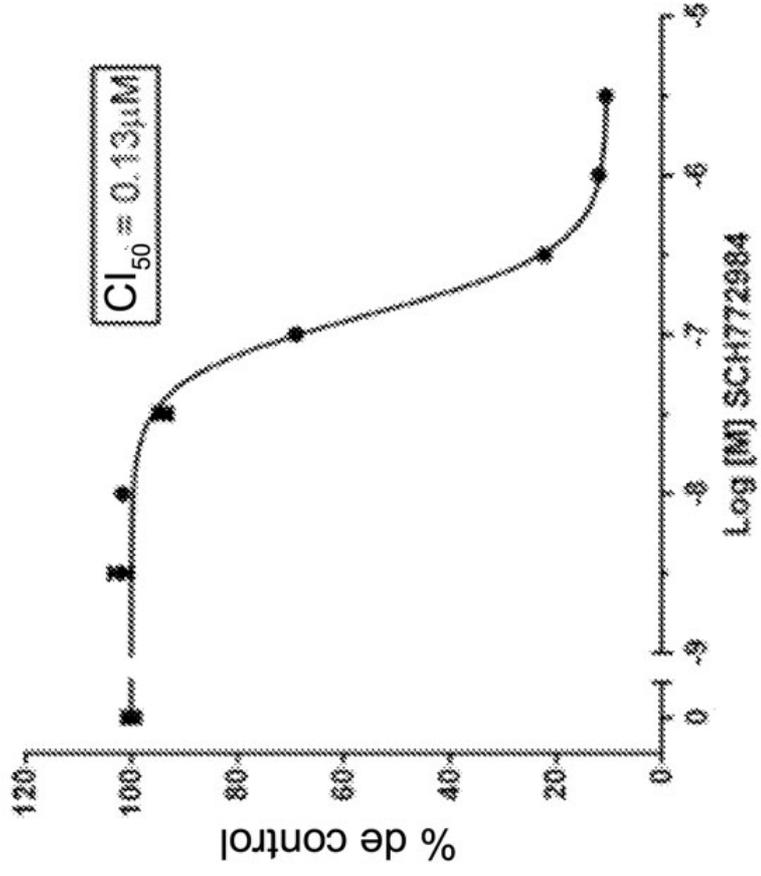


FIG. 39

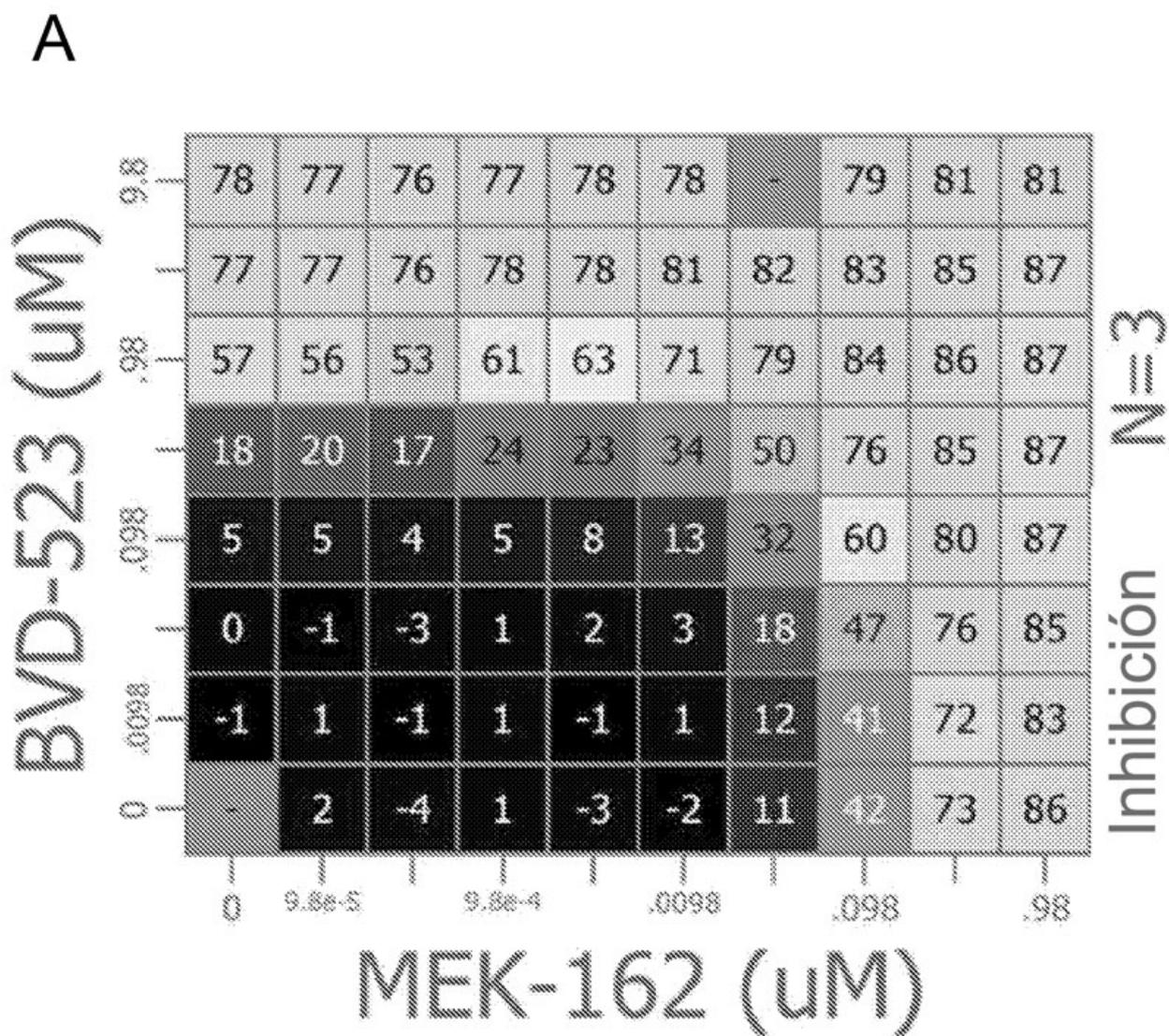
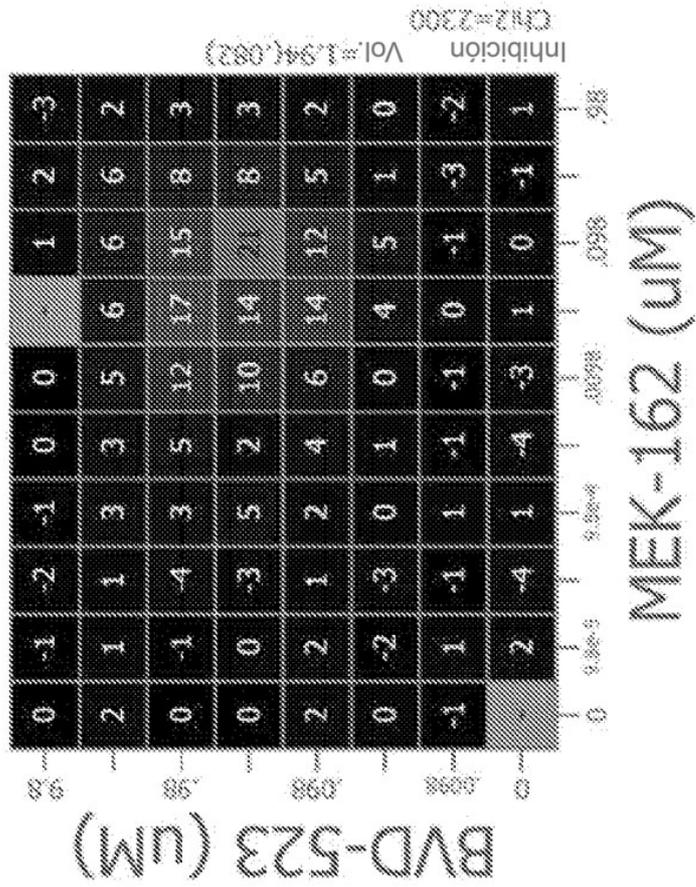


FIG. 39, Cont.

B



C

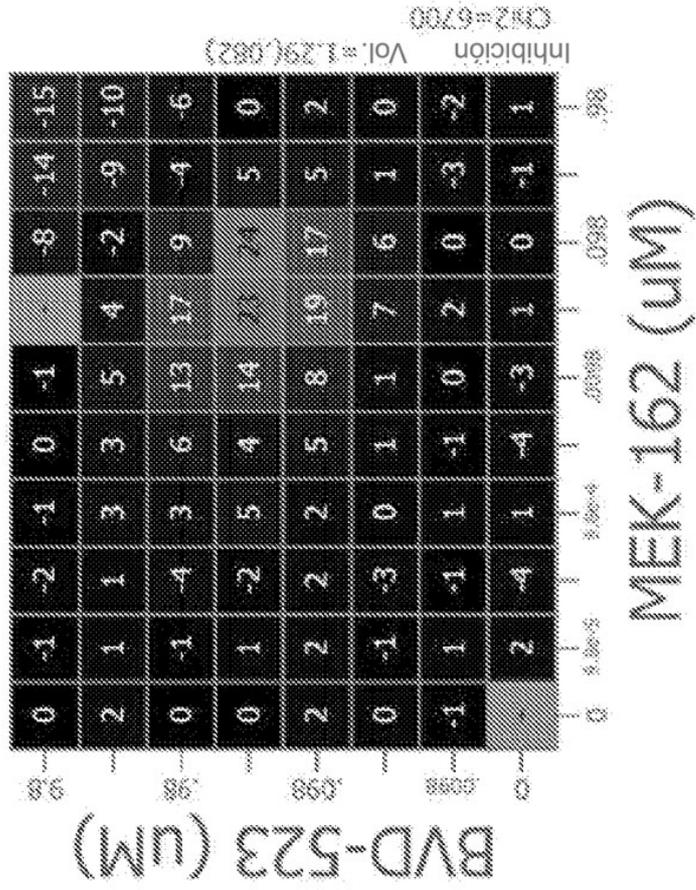
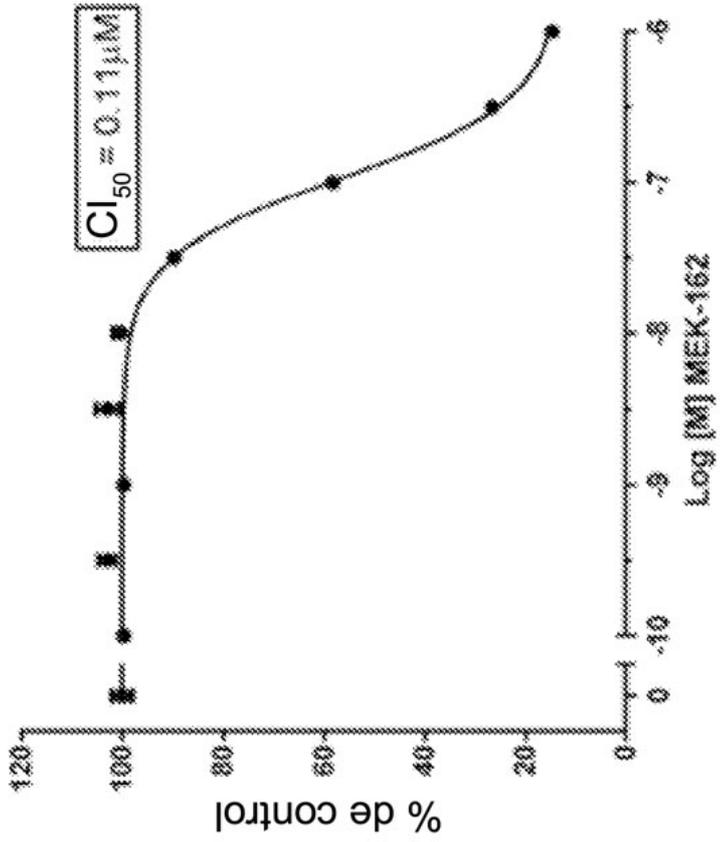


FIG. 39, Cont.

D

G-361: agente único de MEK-162



E

G-361: agente único de BVD-0523

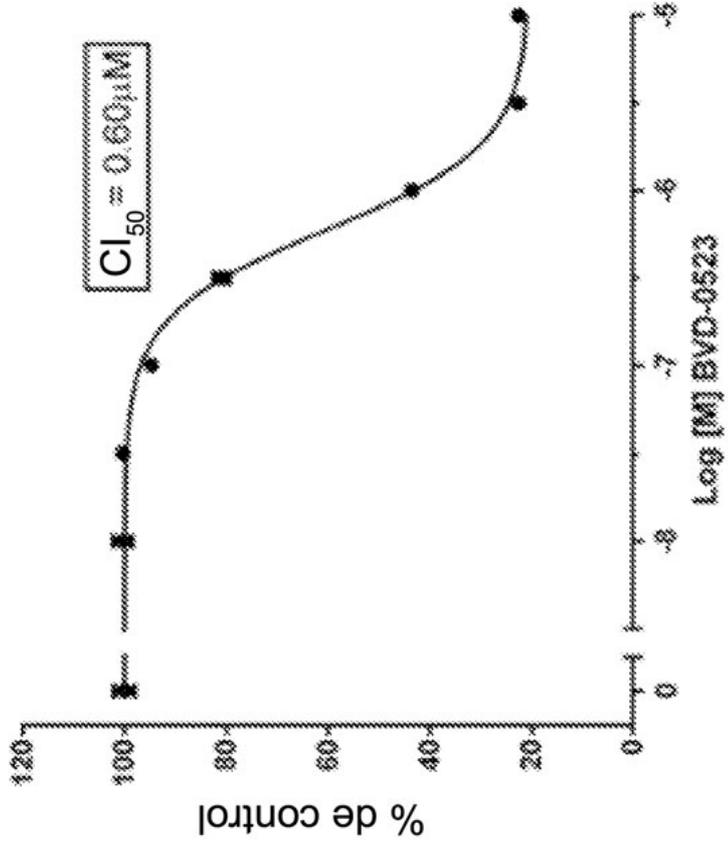


FIG. 40

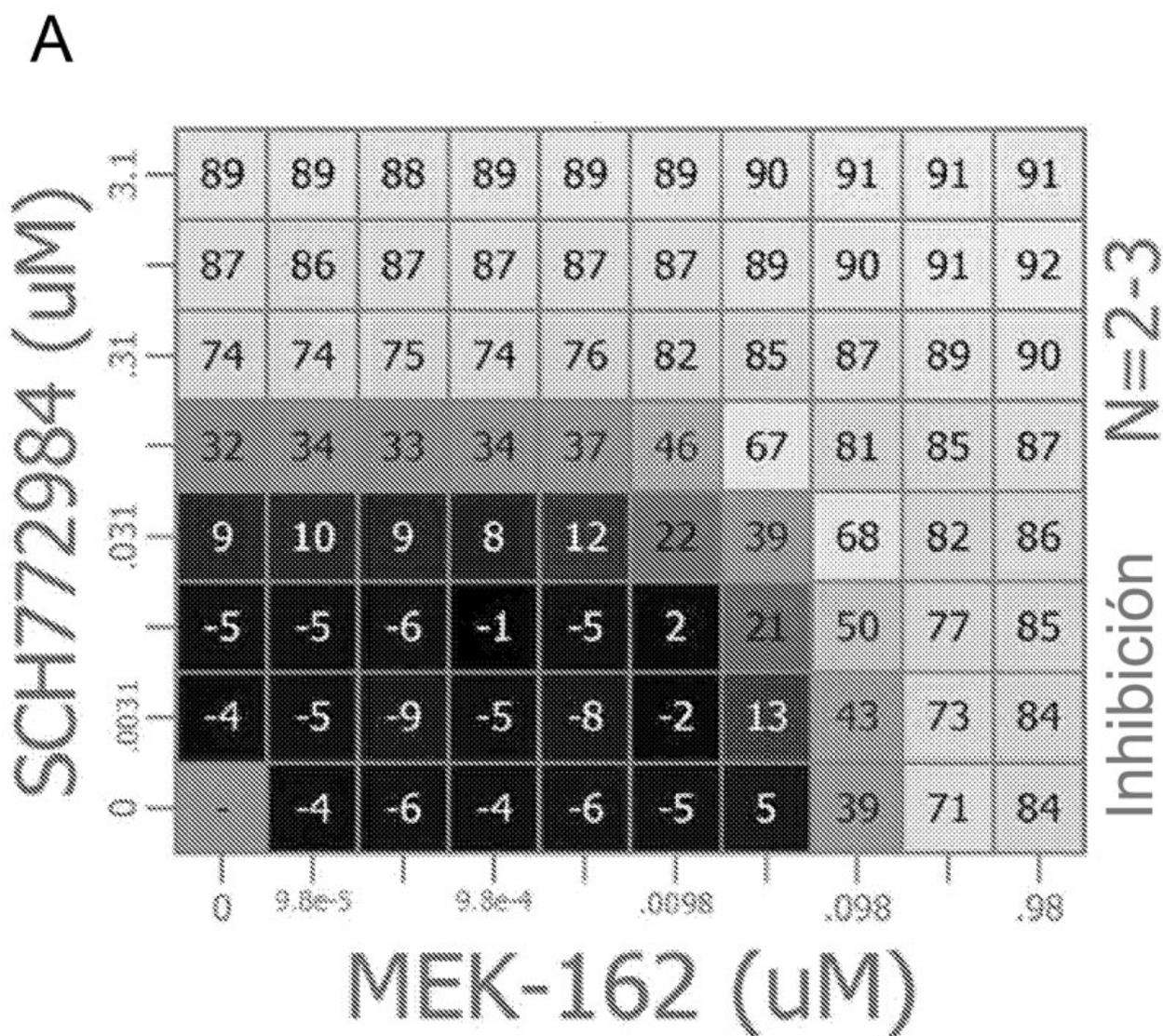
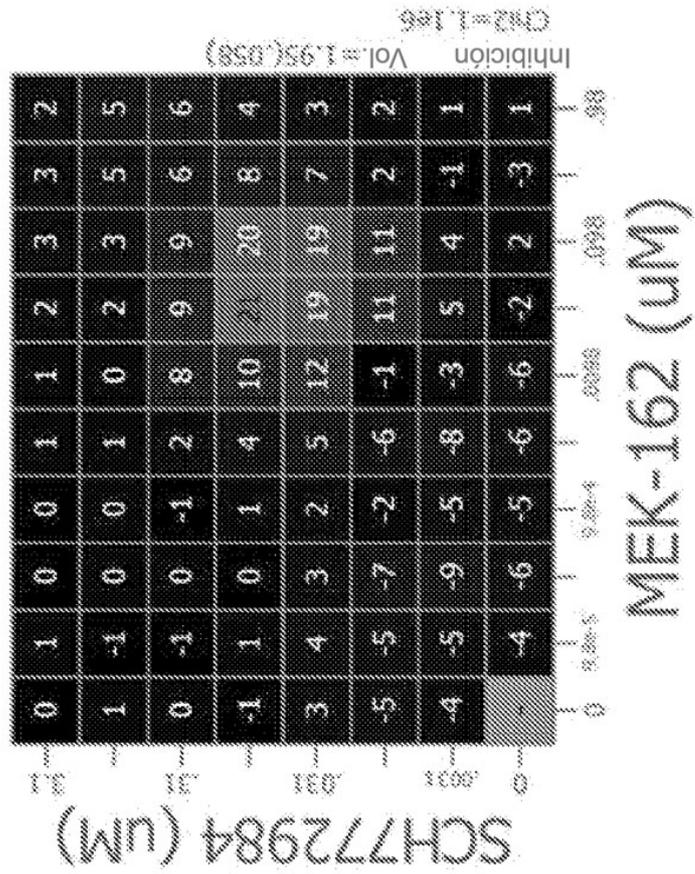


FIG. 40, Cont.

B



C

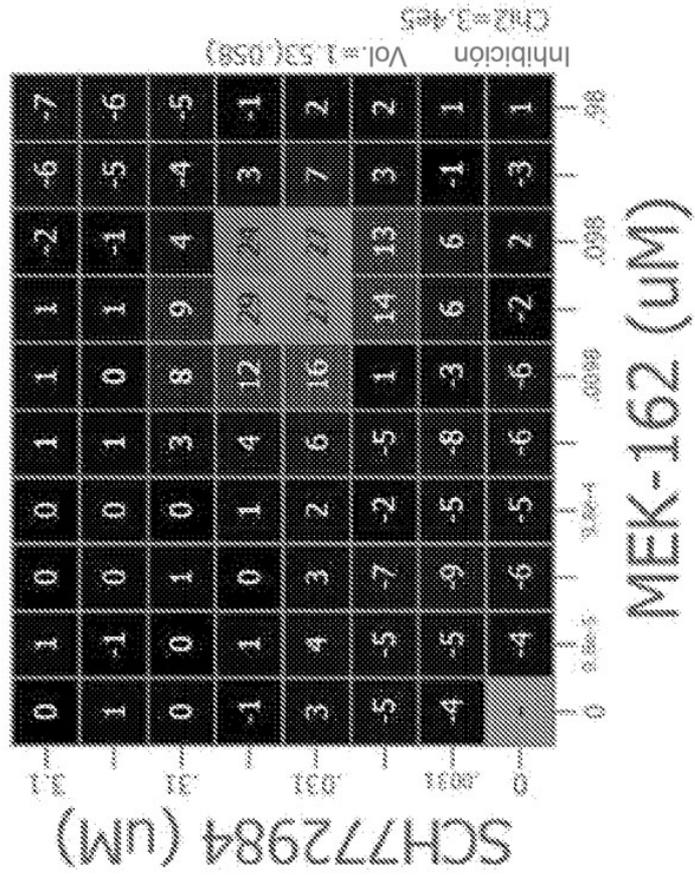


FIG. 40, Cont.

D

G-361: agente único de MEK-162

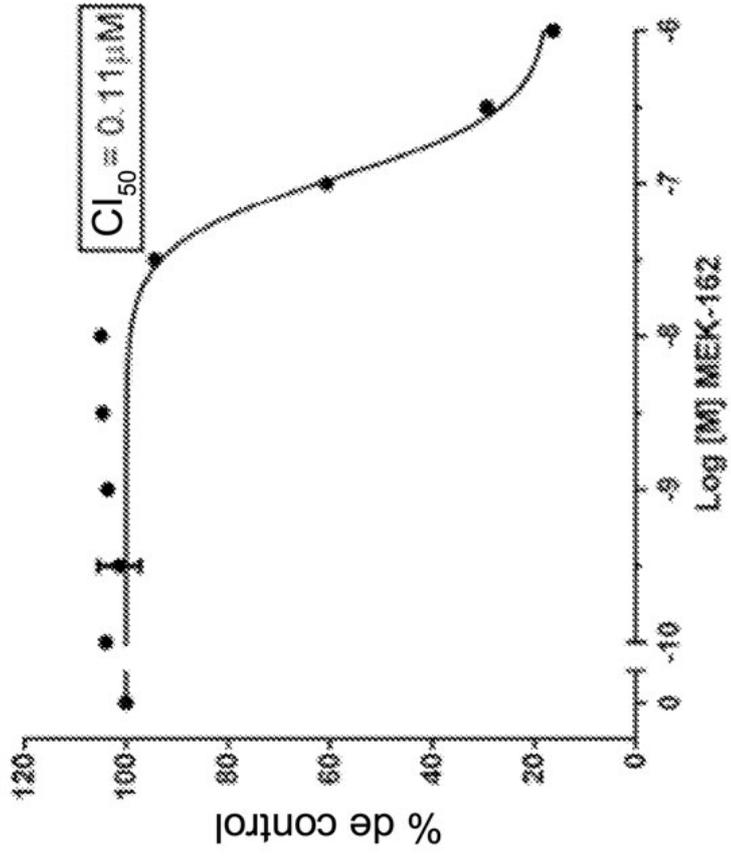


FIG. 41

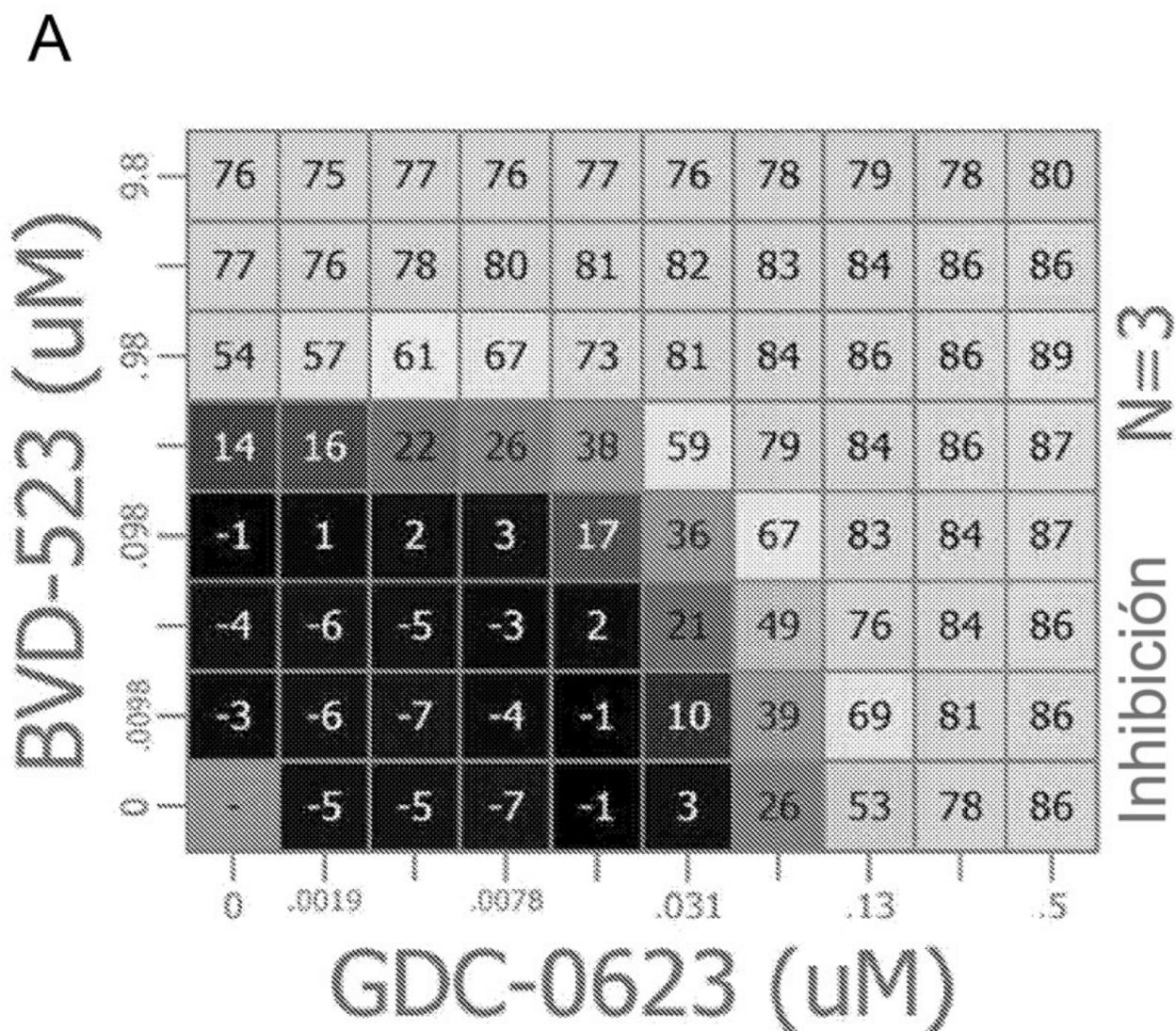
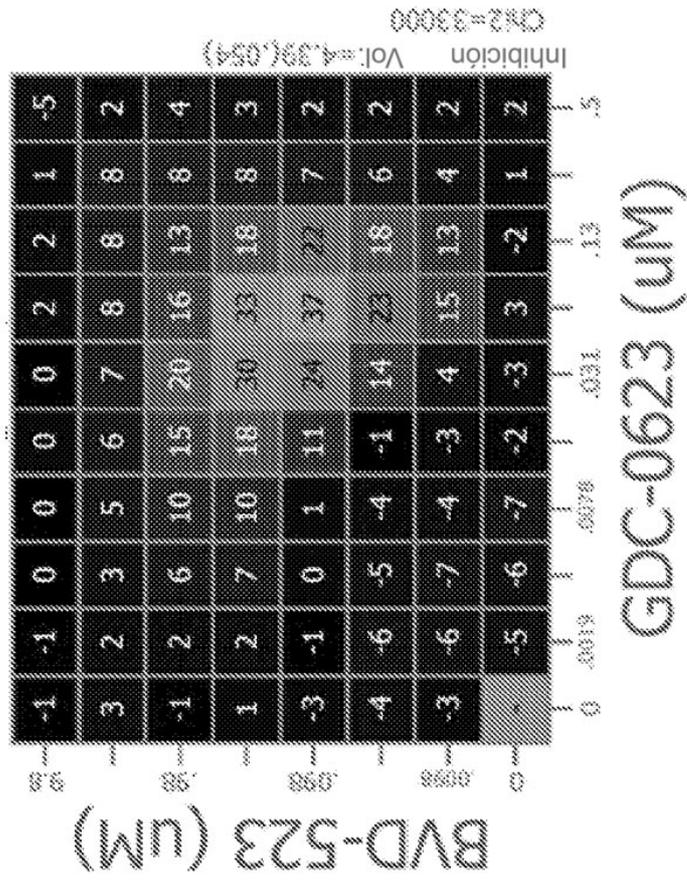


FIG. 41, Cont.

**B**



**C**

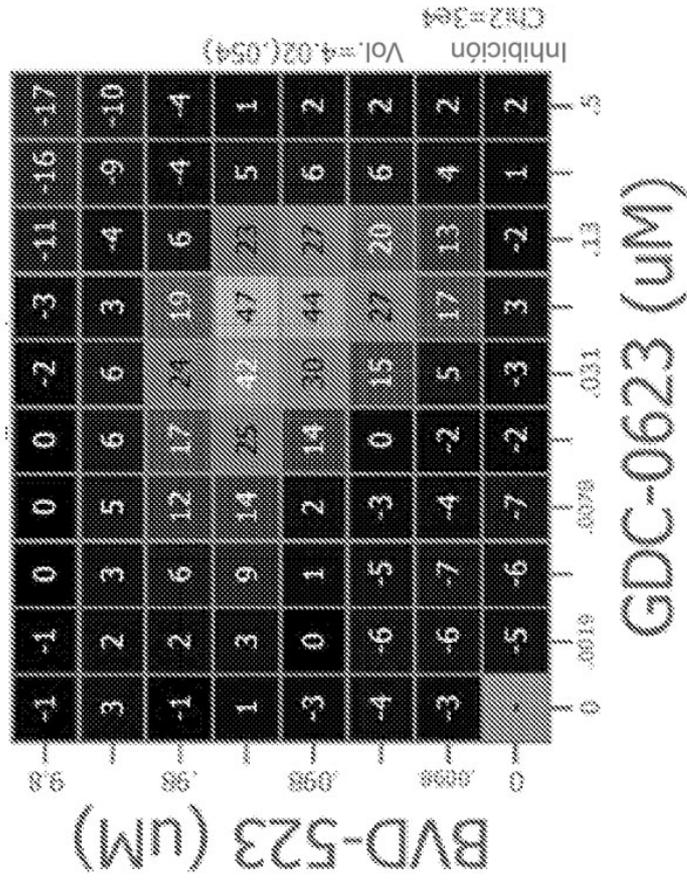
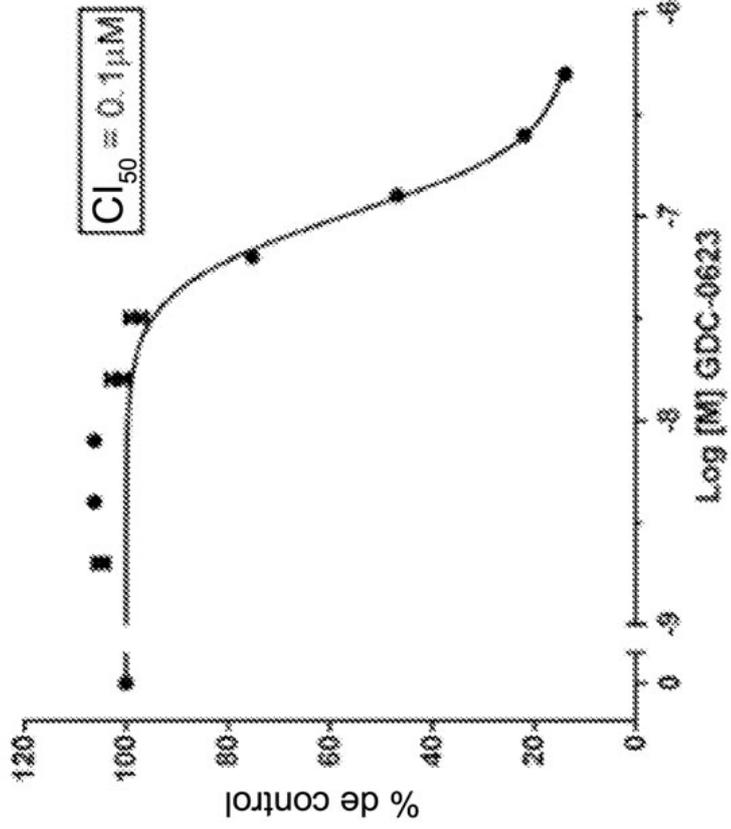


FIG. 41, Cont.

D

G-361: agente único de GDC-0623



E

G-361: agente único de BVD-0523

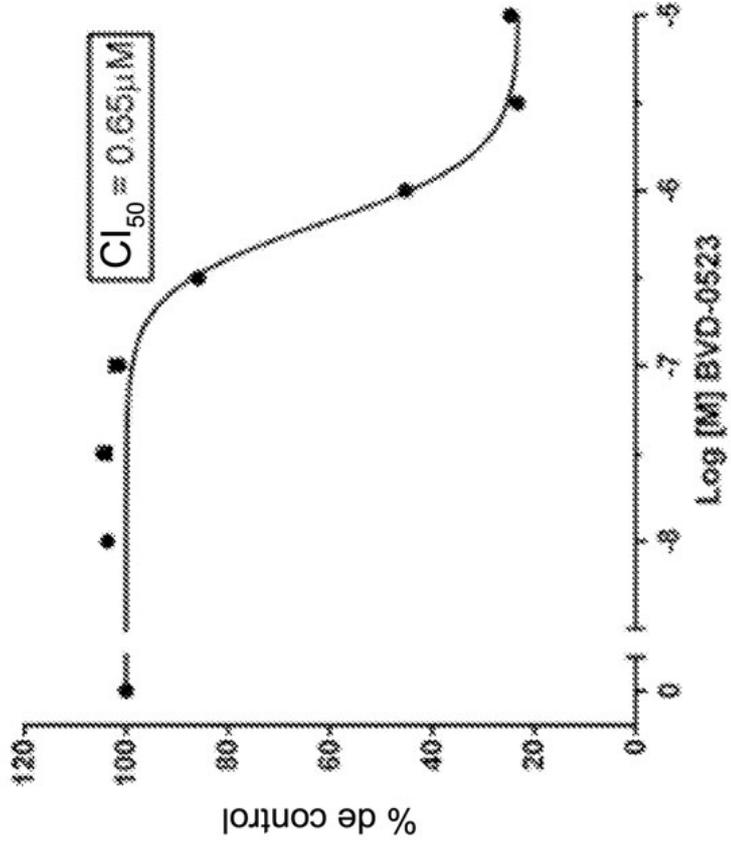


FIG. 42

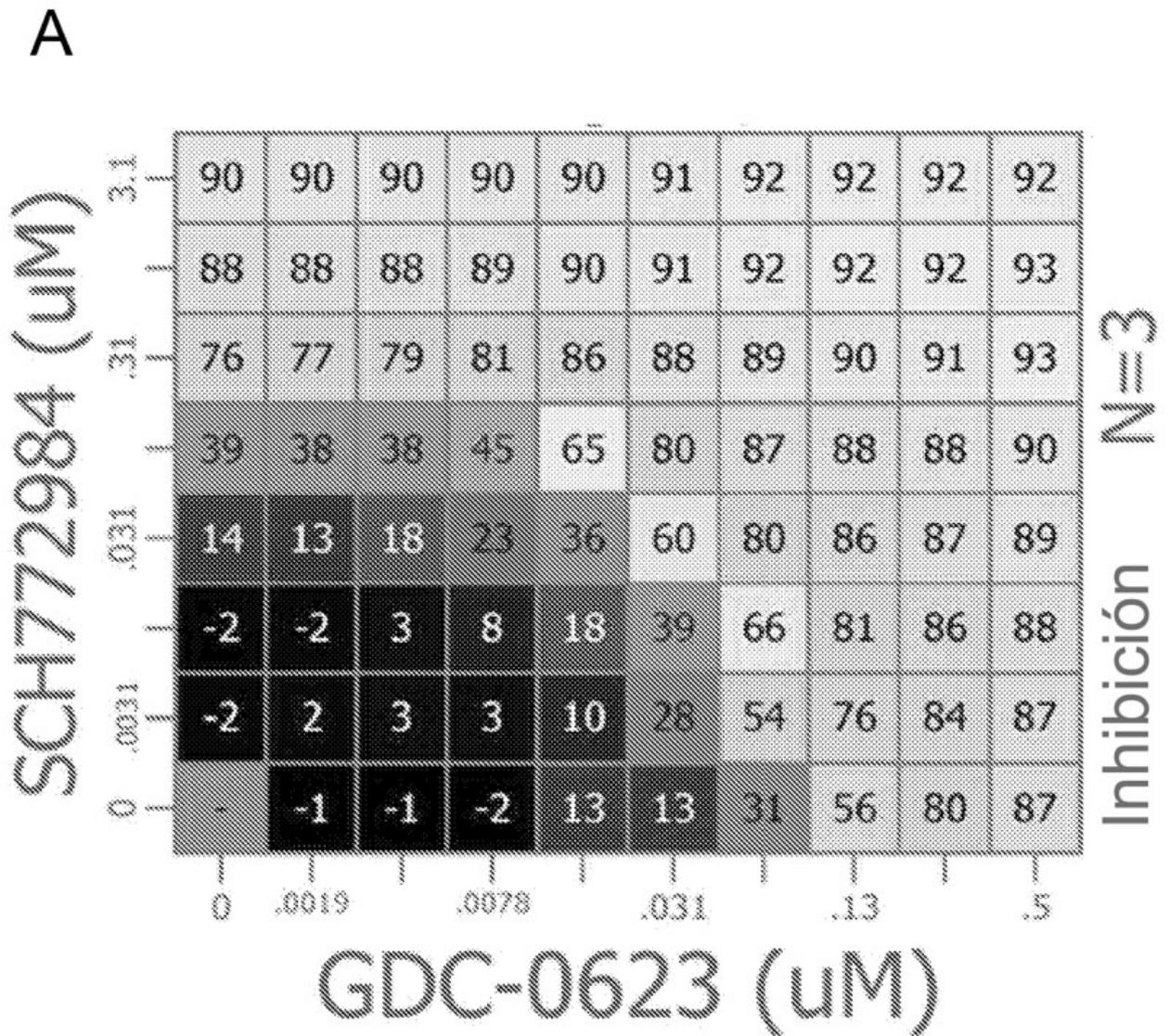
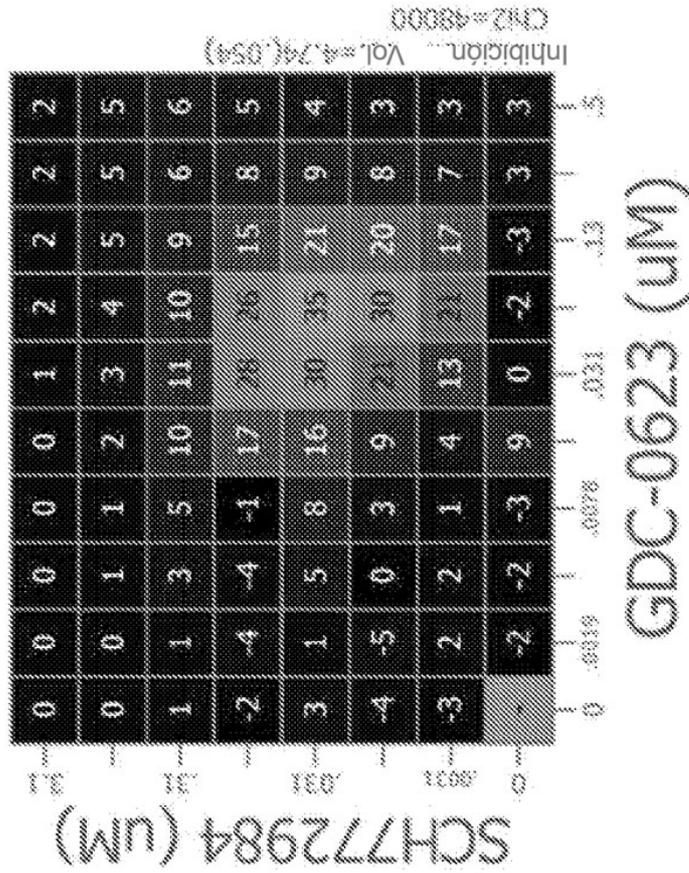


FIG. 42, Cont.

B



C

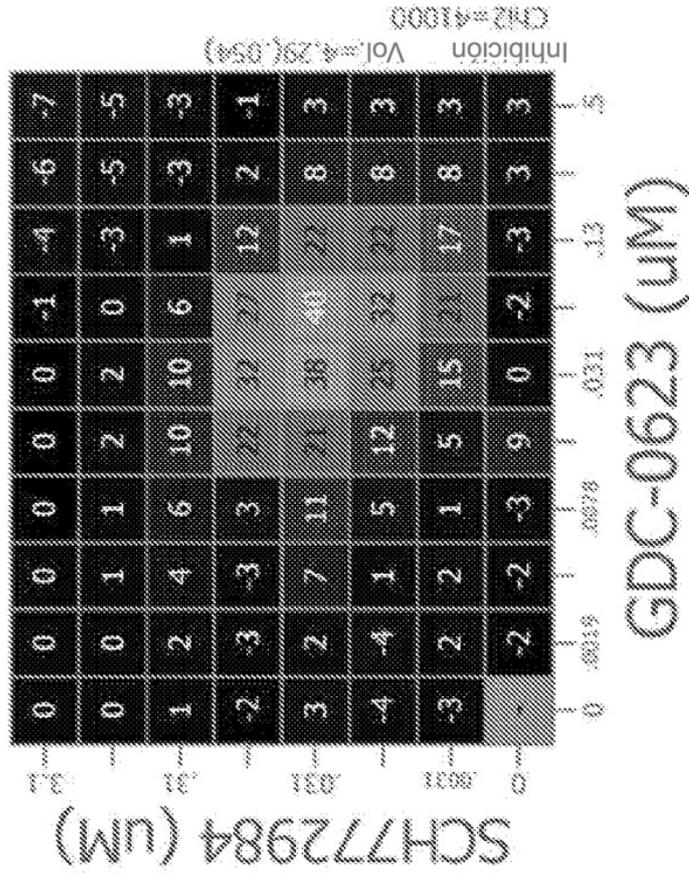
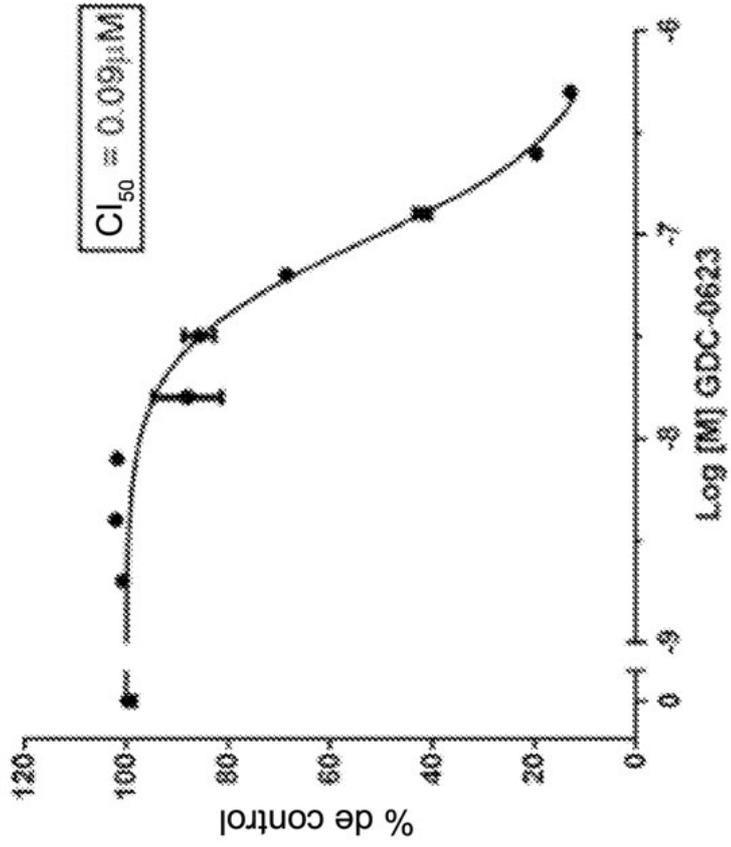


FIG. 42, Cont.

D

G-361: agente único de GDC-0623



E

G-361: agente único de SCH772984

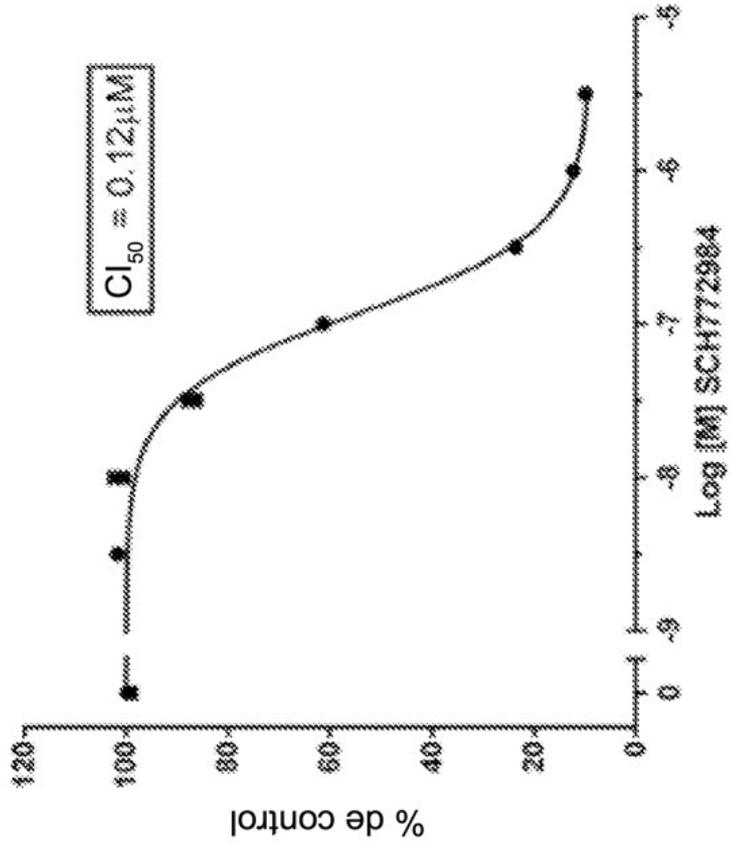


FIG. 43

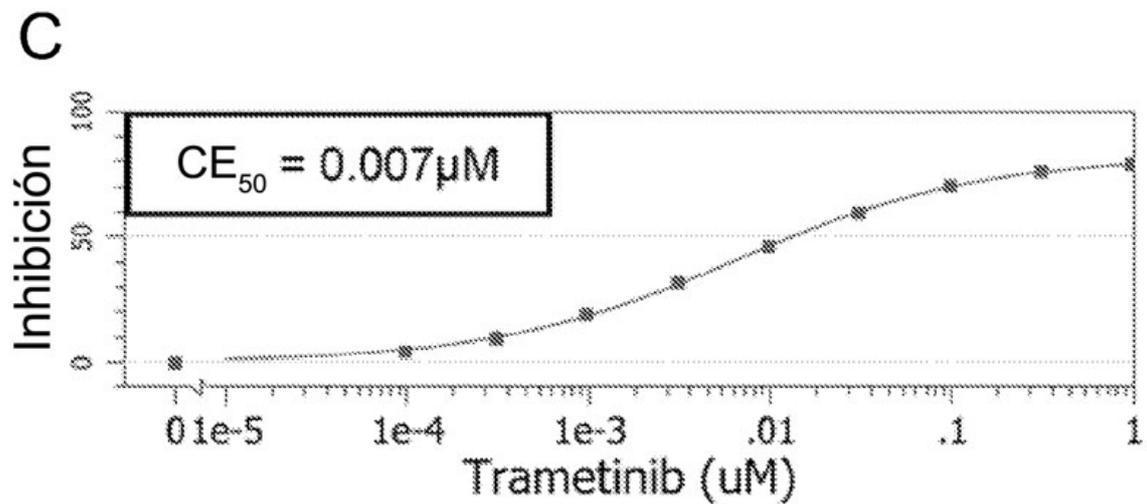
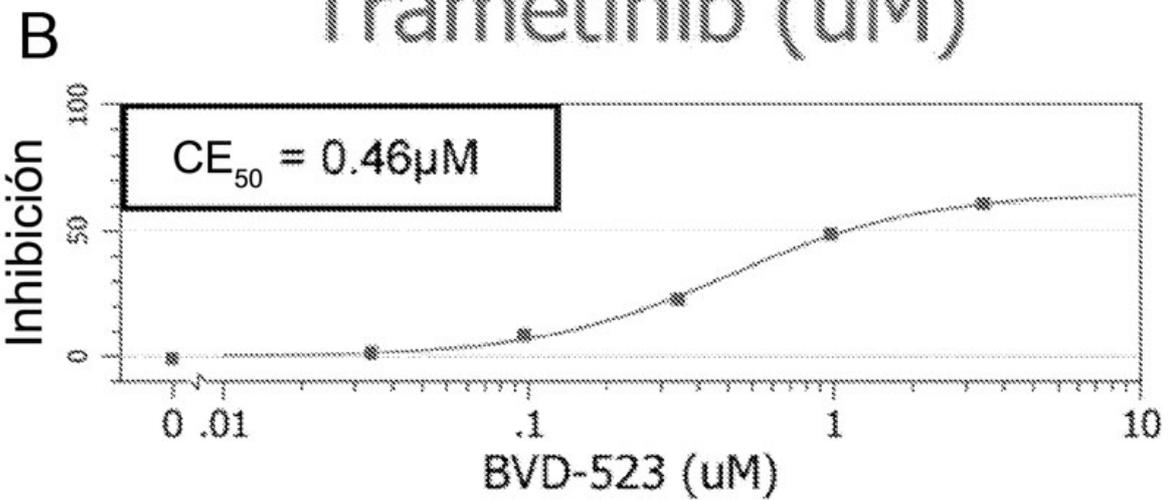
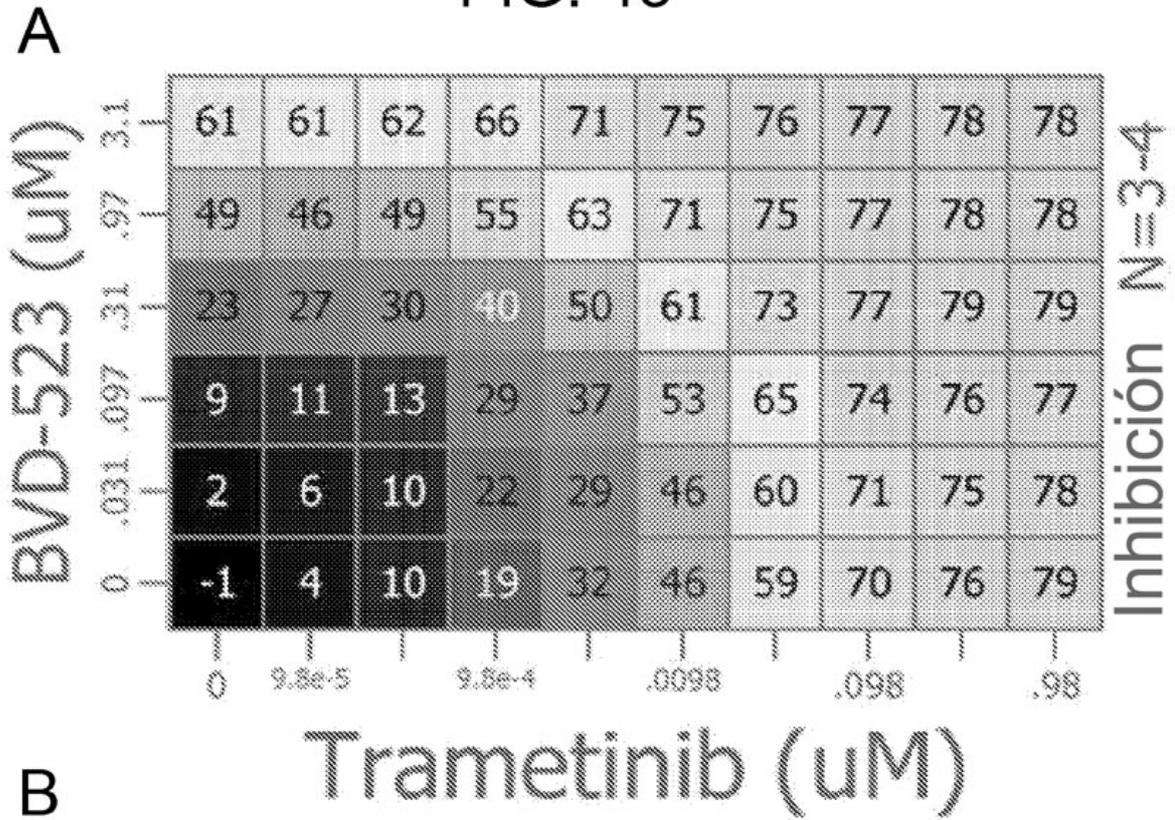
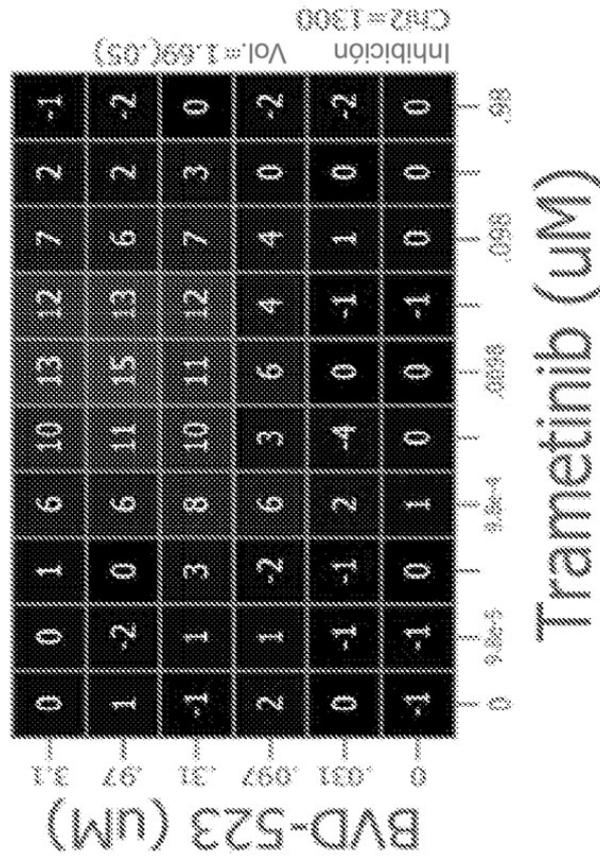


FIG. 43, Cont.

D



E

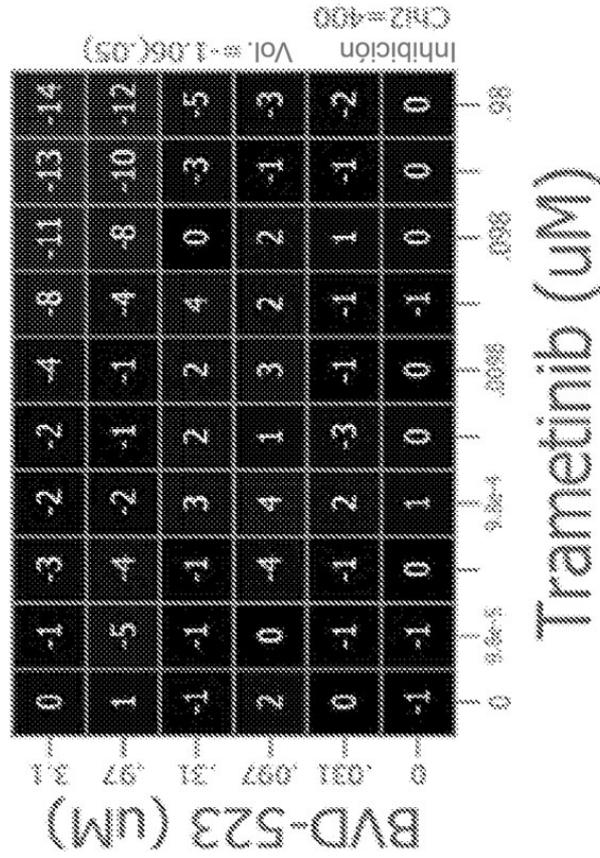


FIG. 44

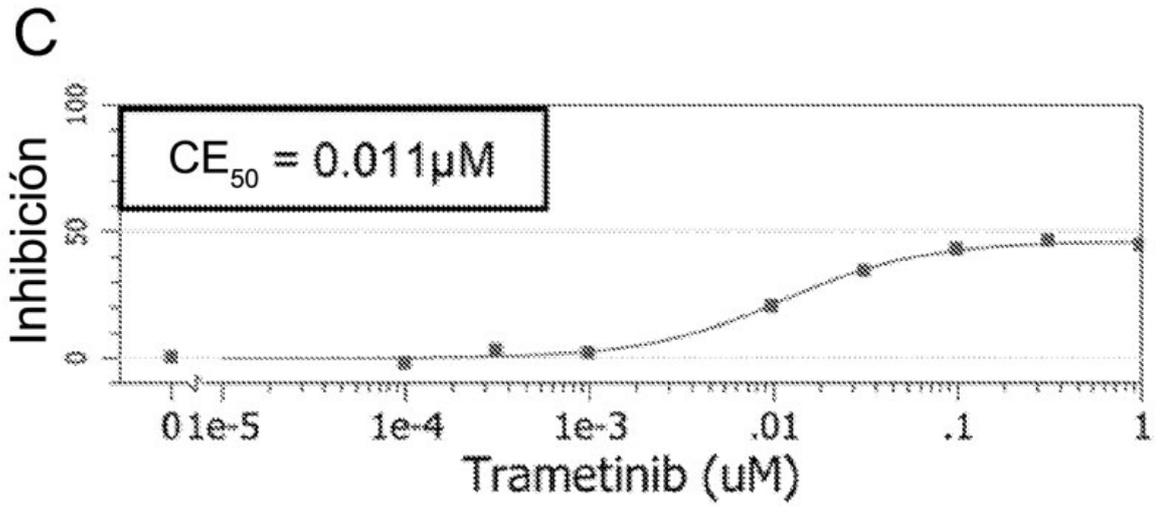
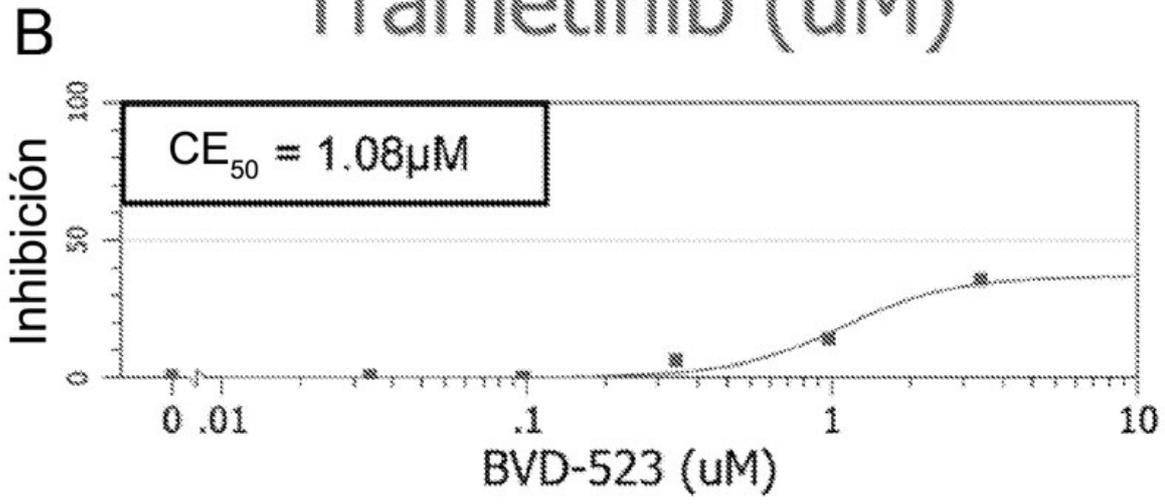
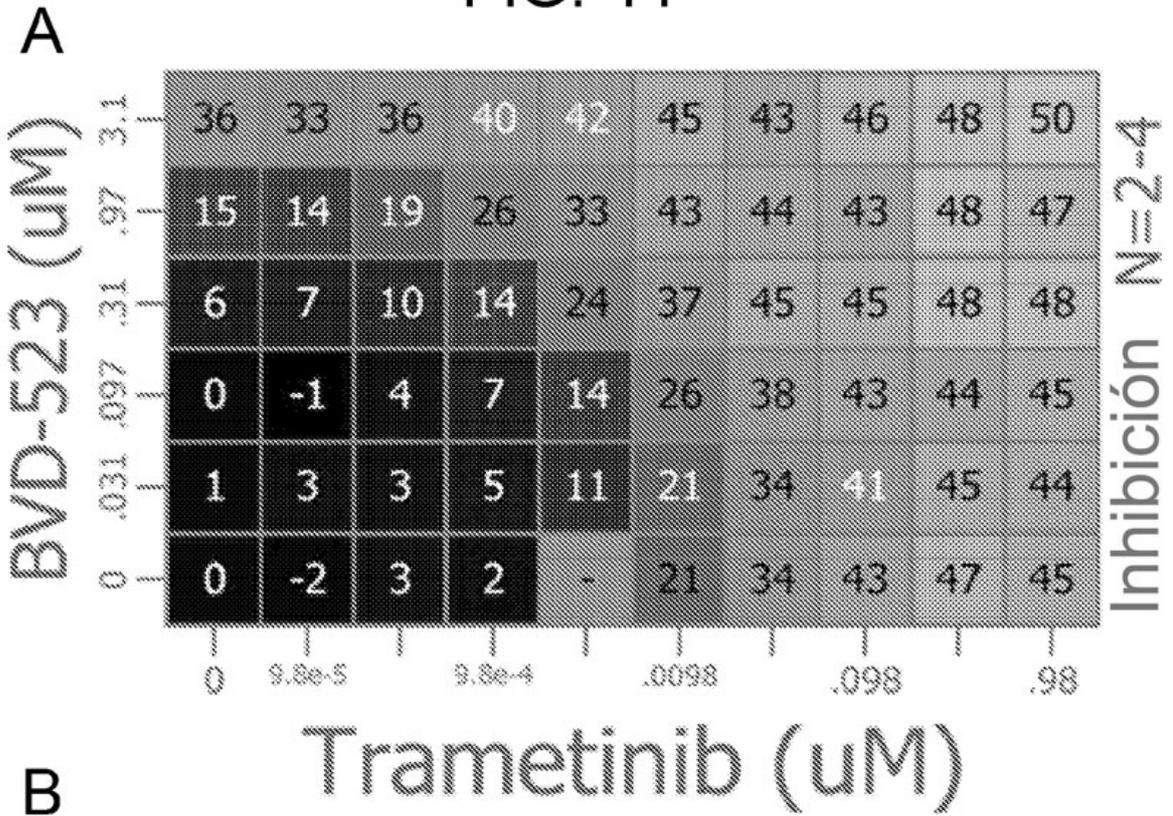
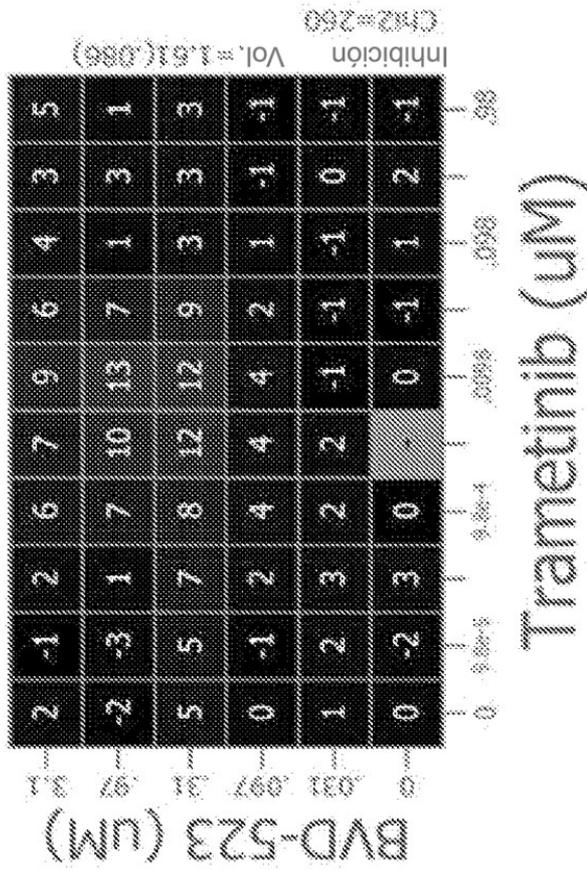


FIG. 44, Cont.

D



E

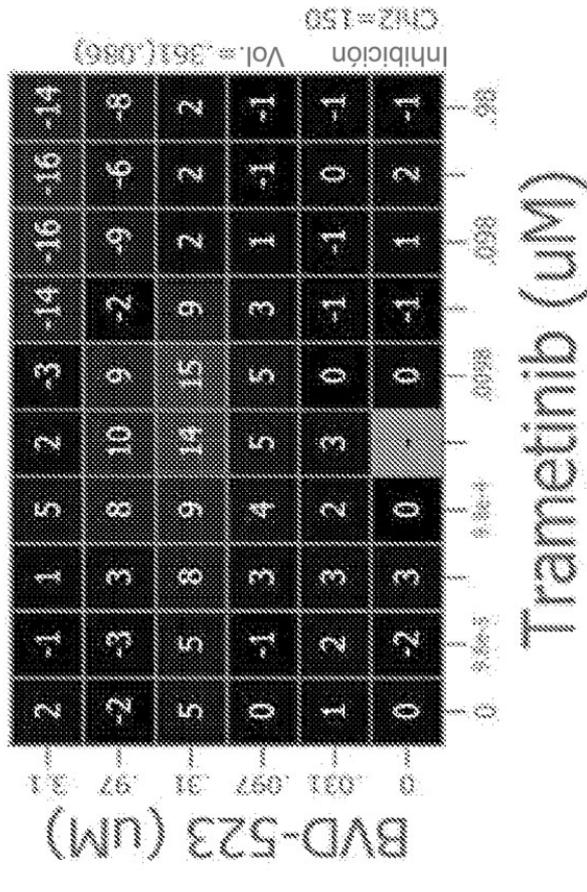


FIG. 45

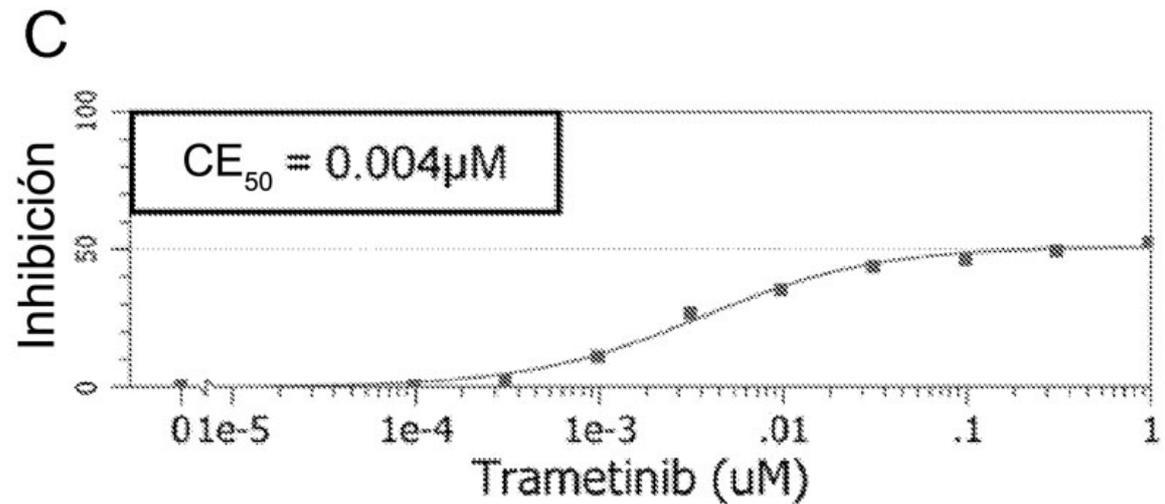
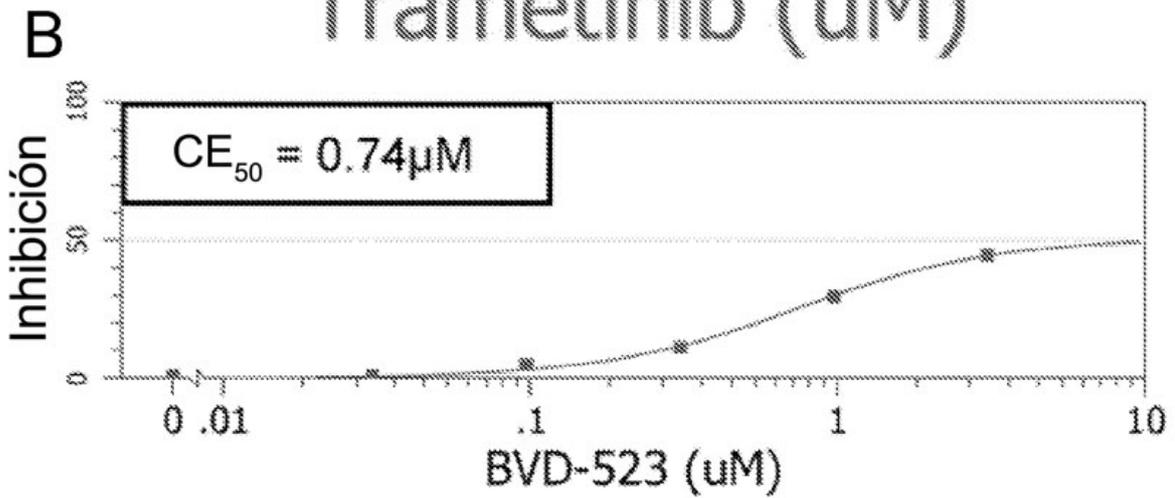
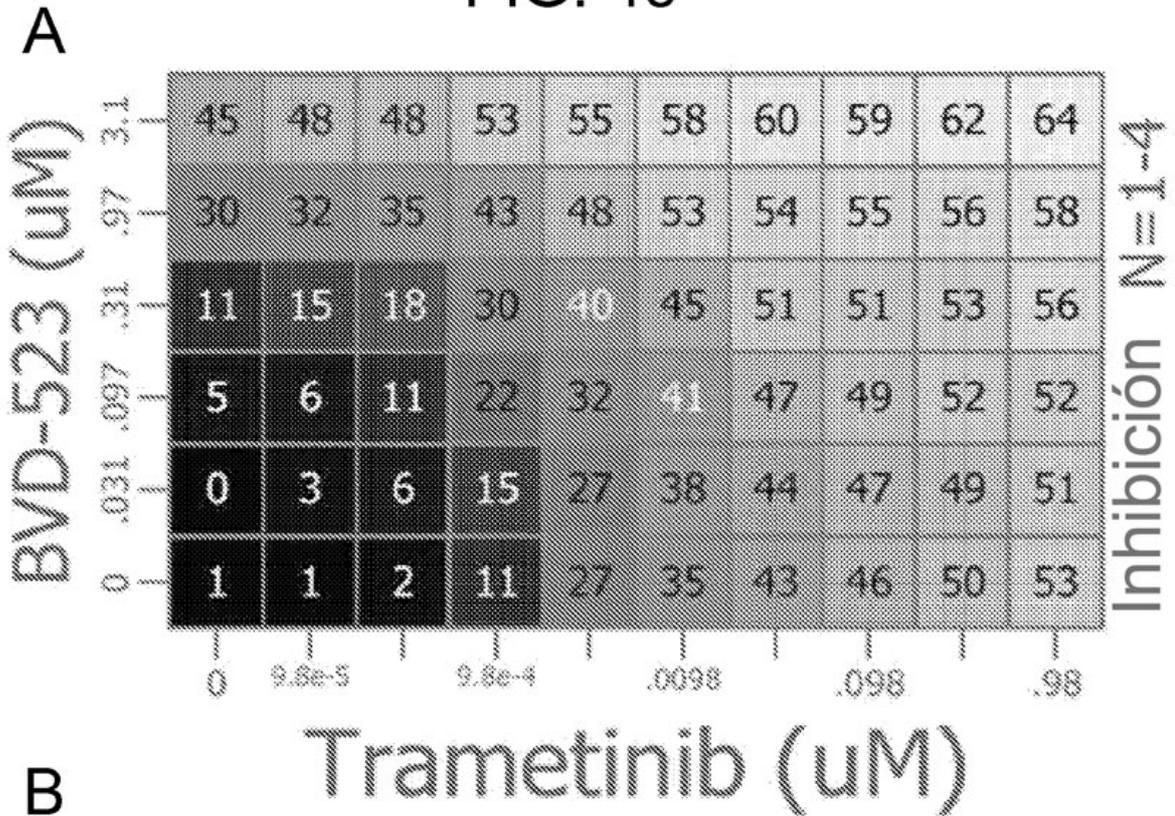
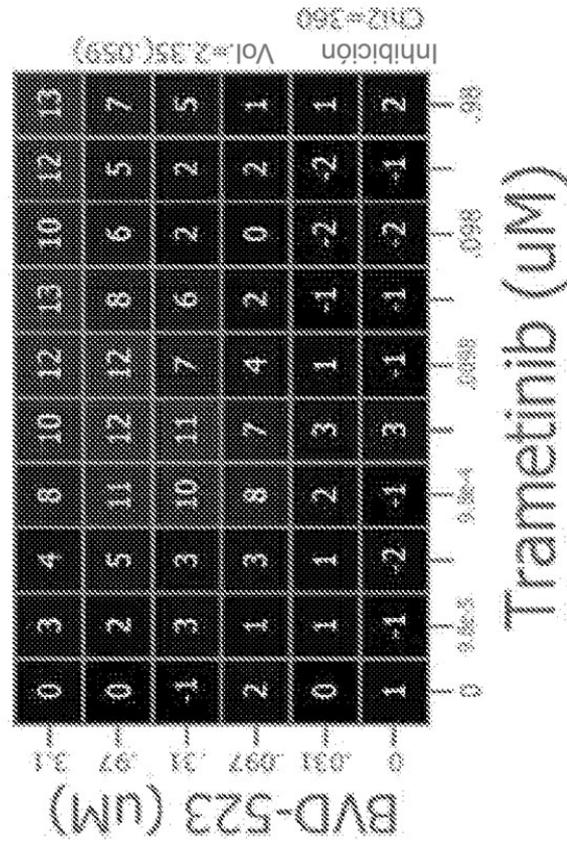


FIG. 45, Cont.

D



E

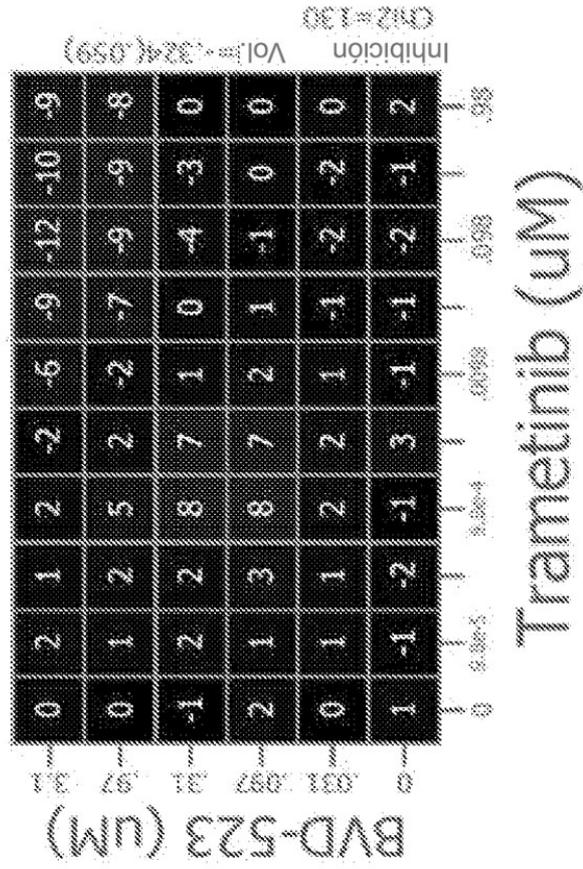


FIG. 46

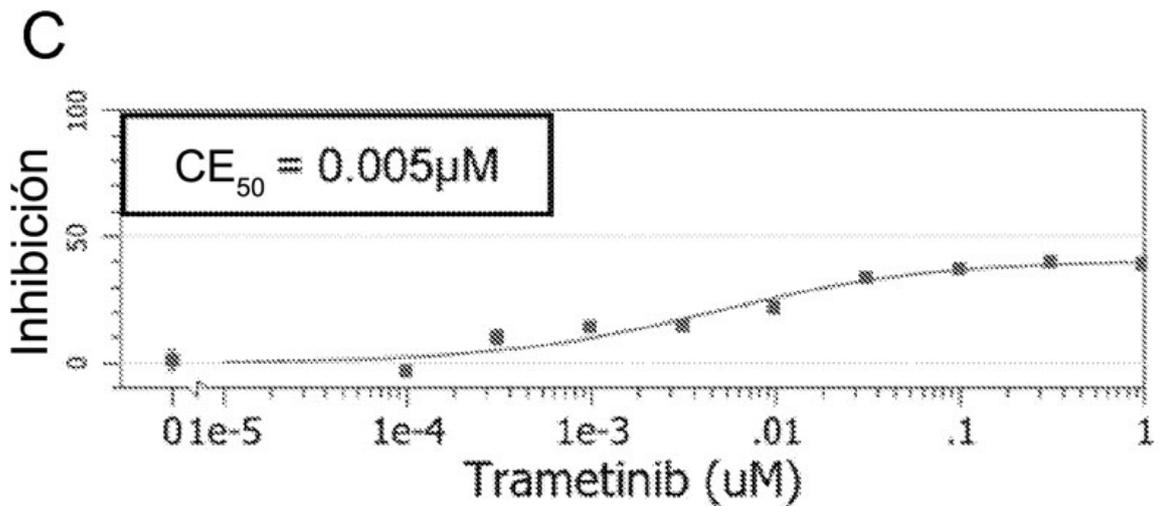
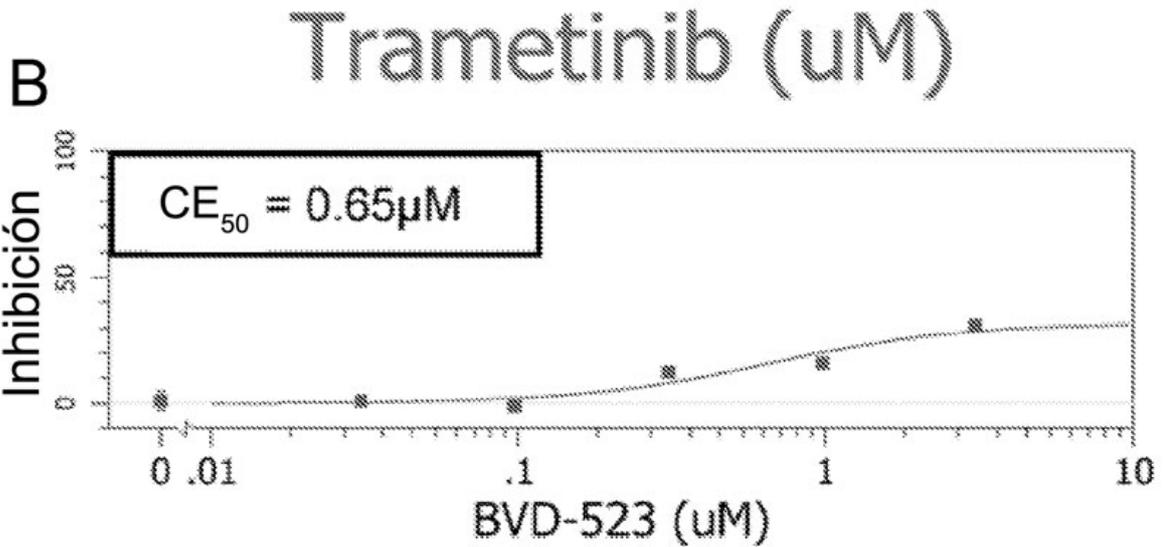
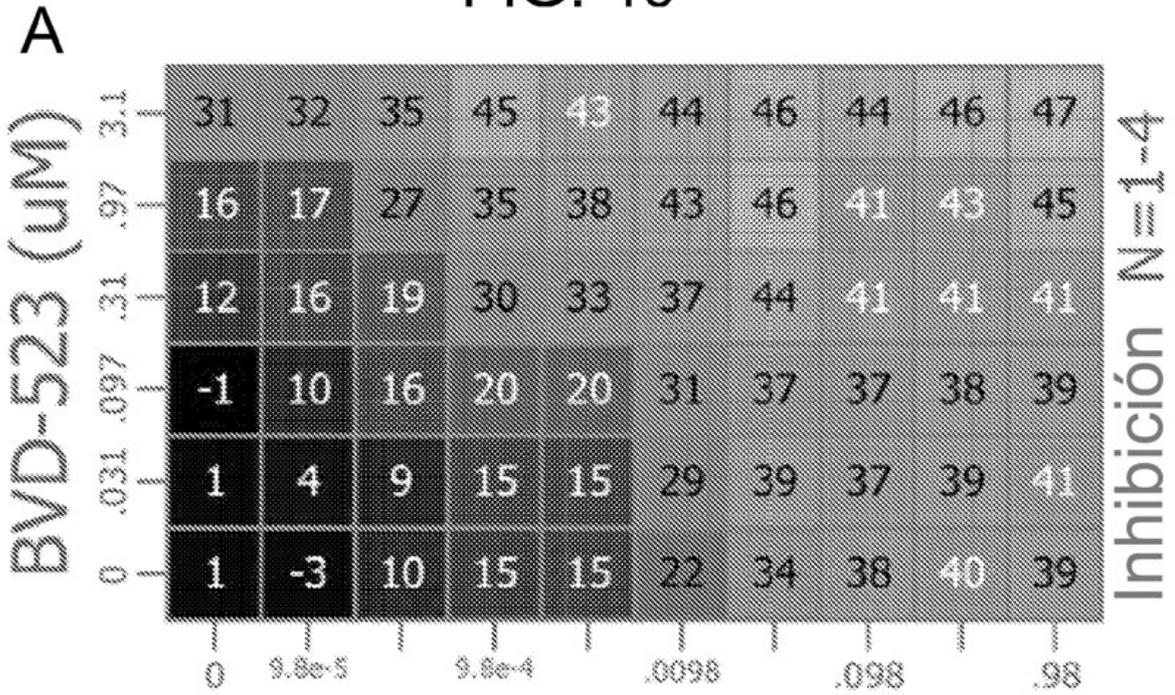




FIG. 47

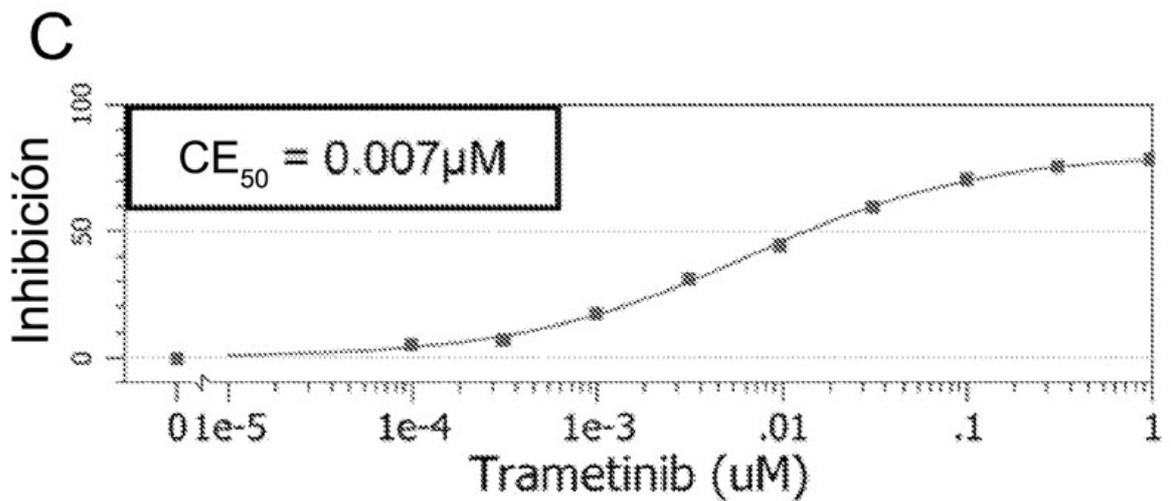
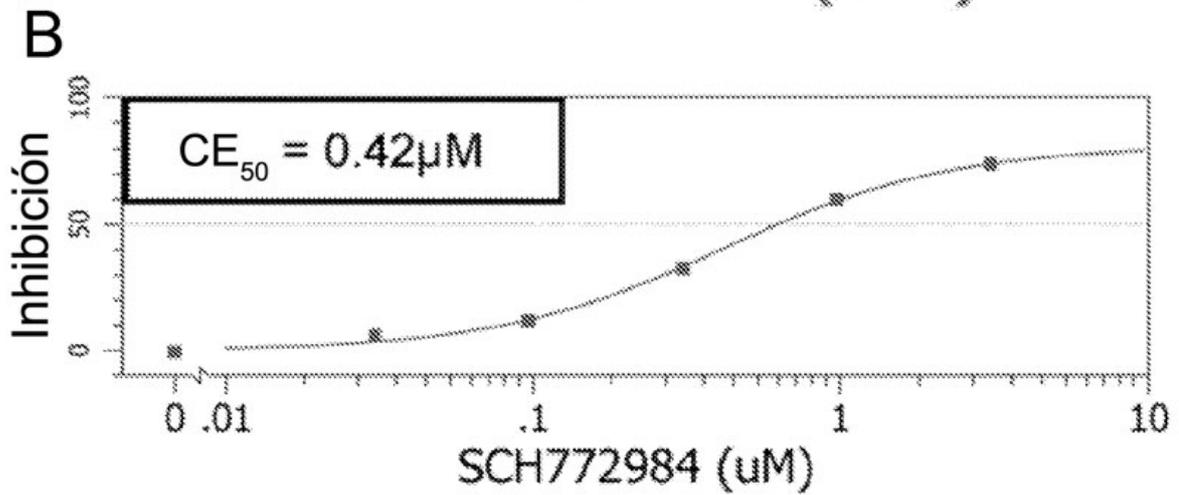
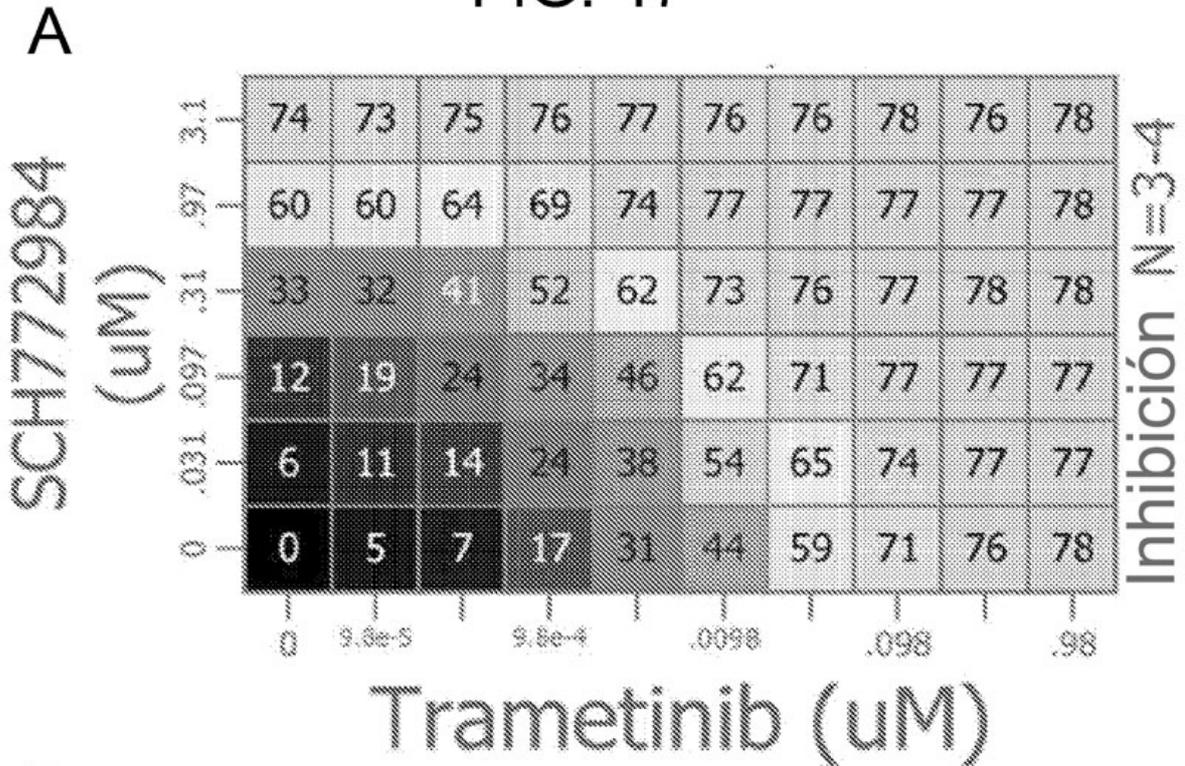
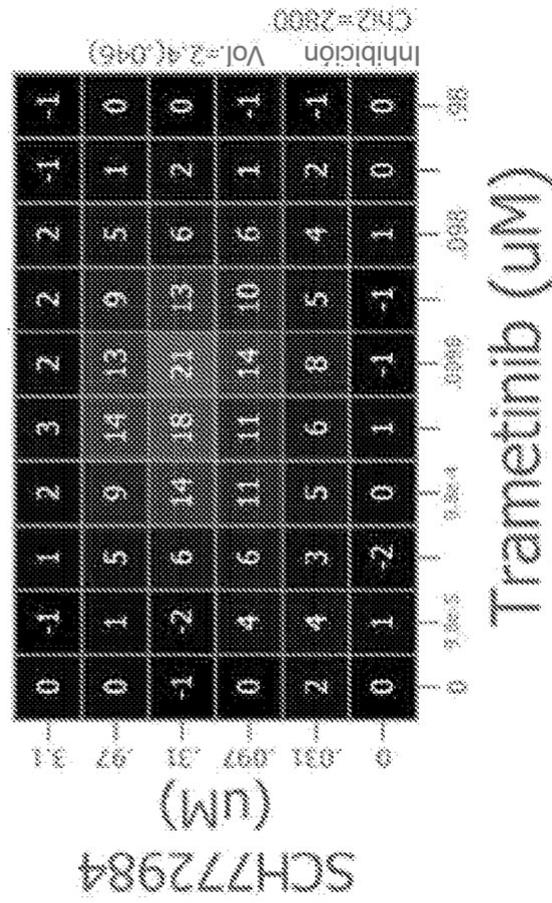


FIG. 47, Cont.

D



E

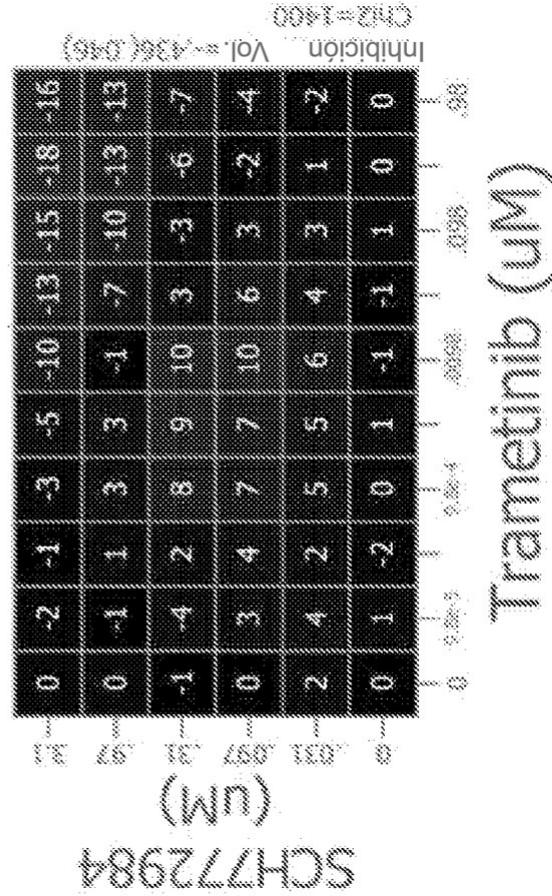
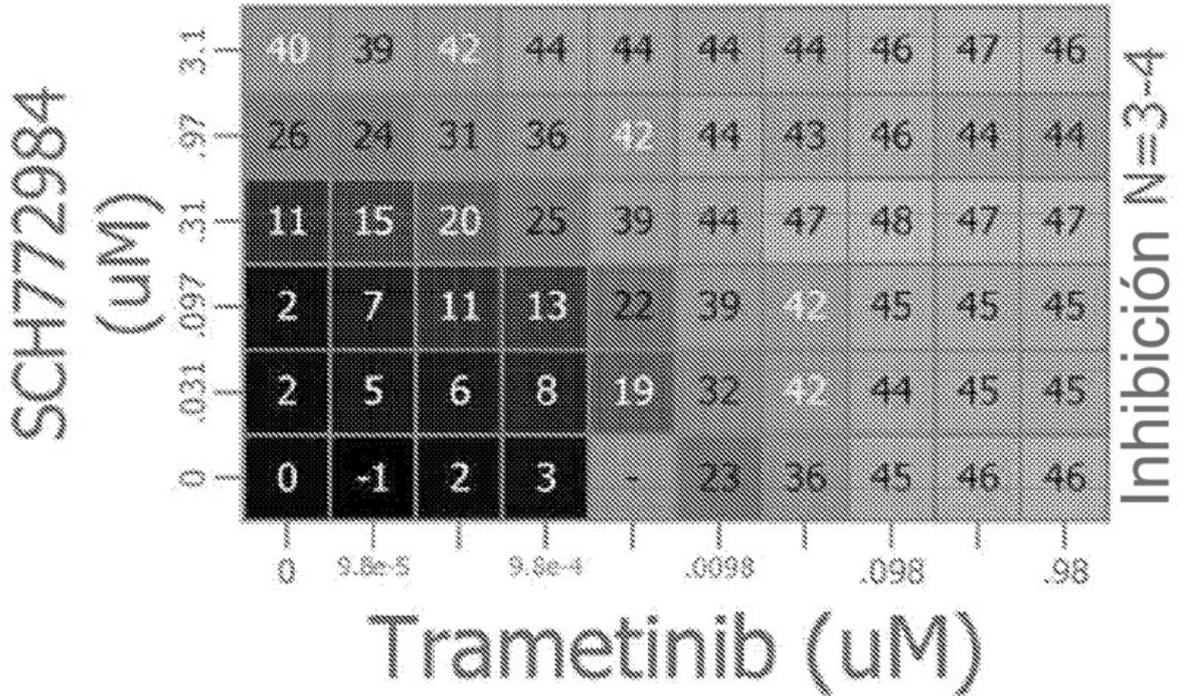
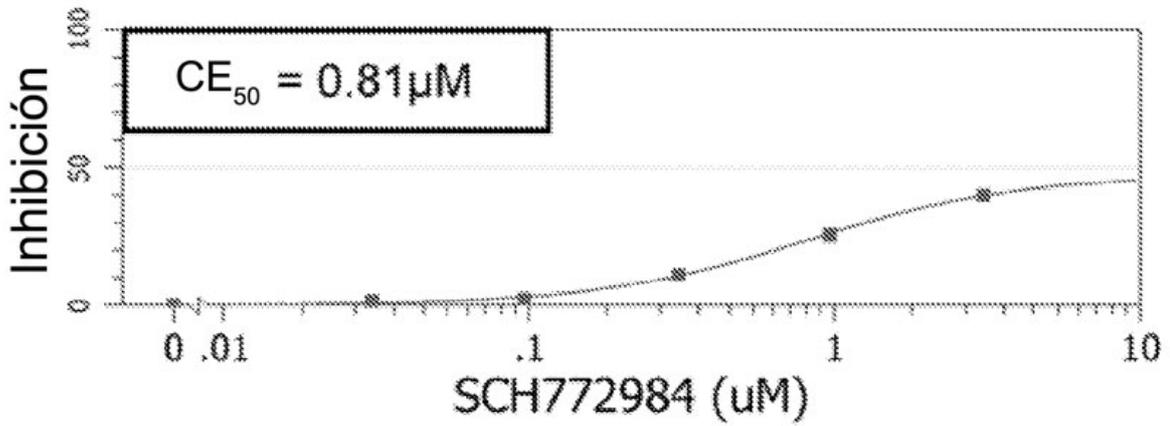


FIG. 48

A



B



C

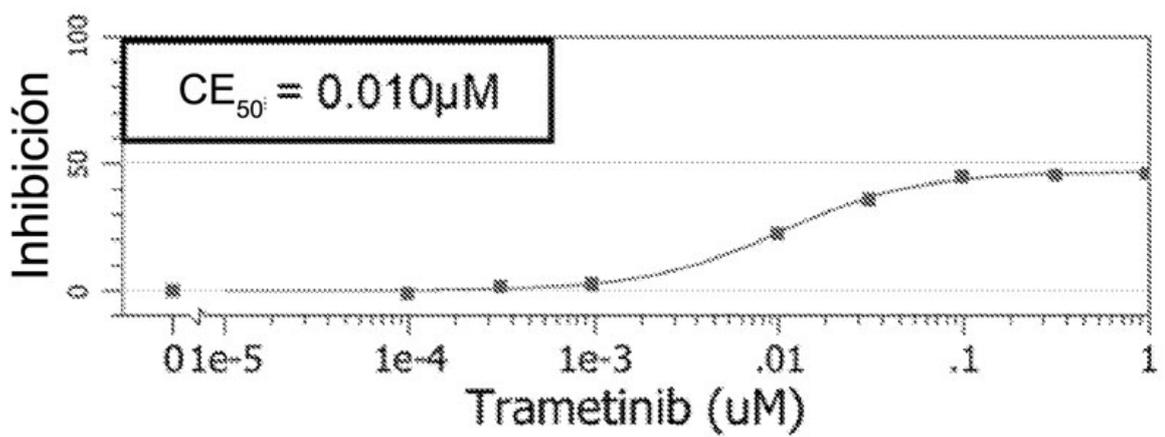
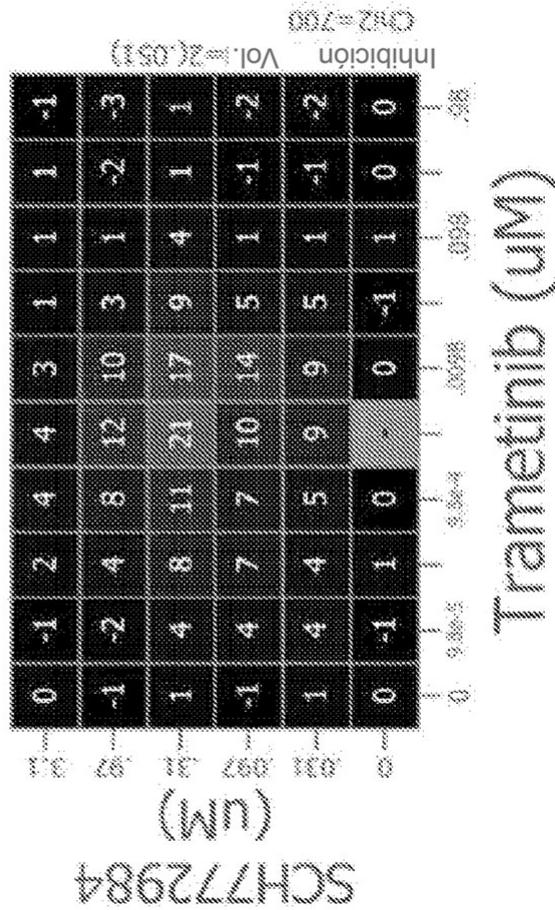


FIG. 48, Cont.

D



E

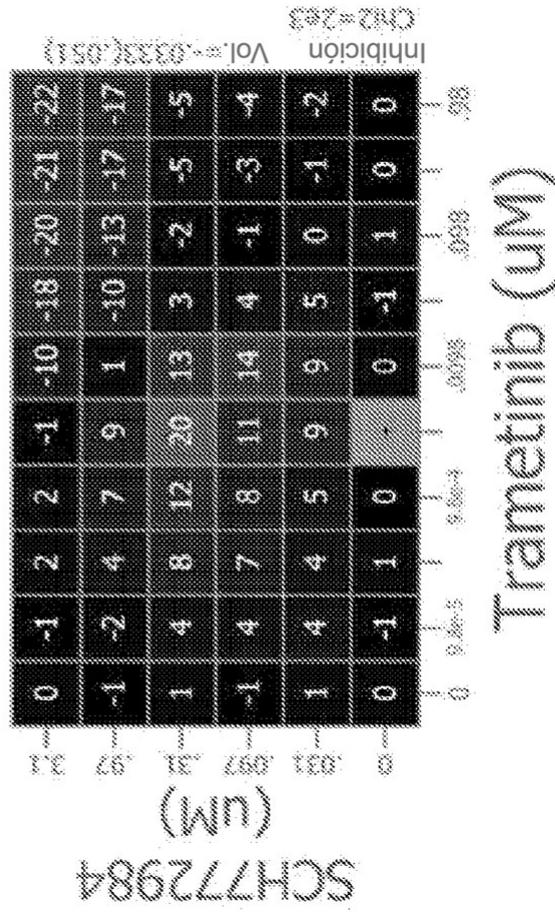
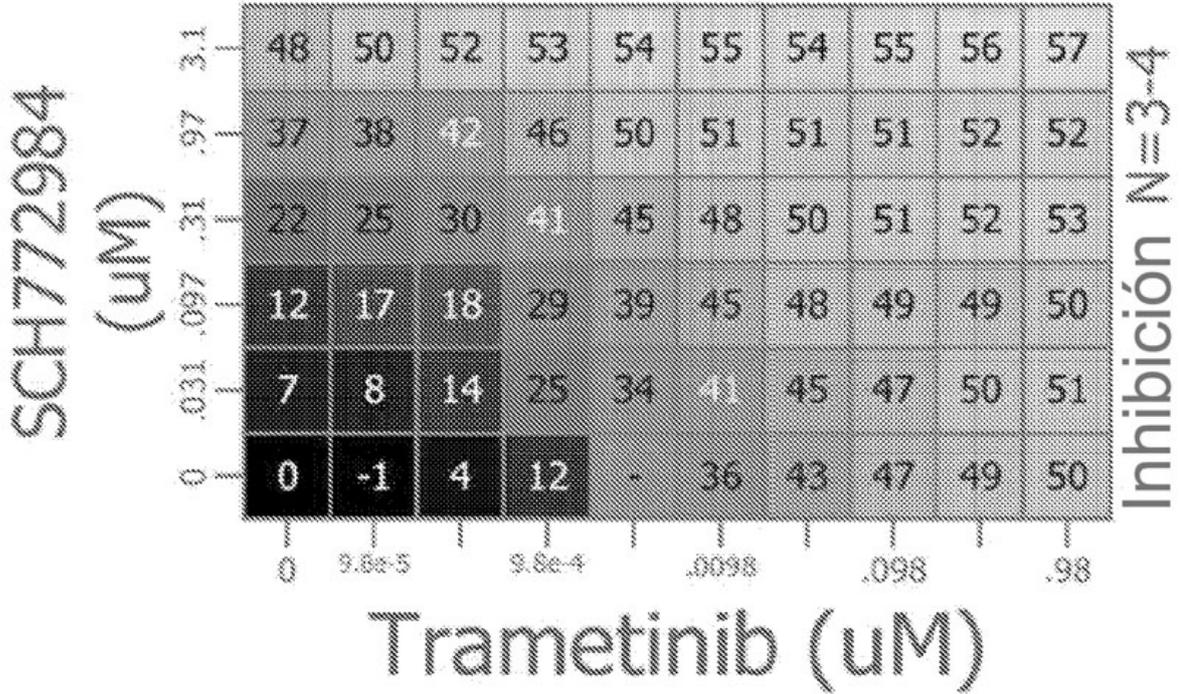
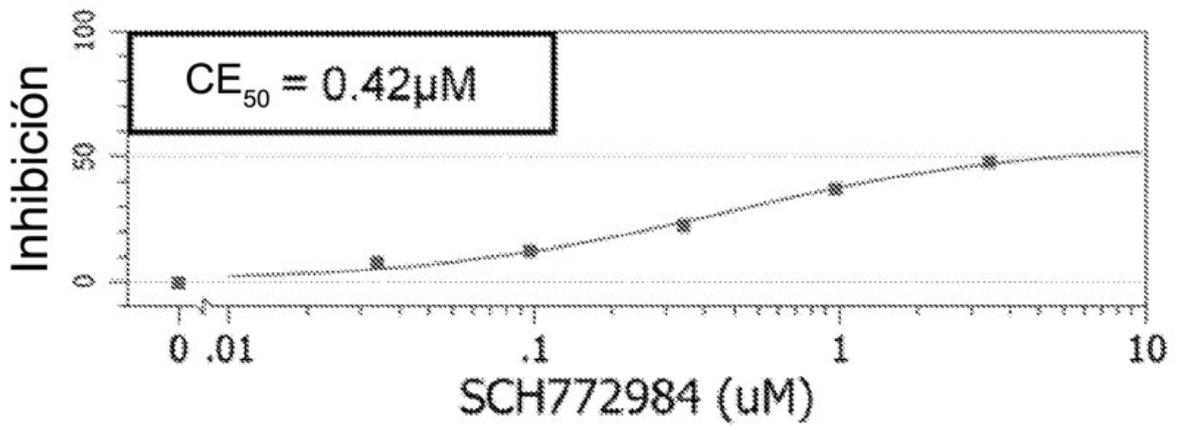


FIG. 49

A



B



C

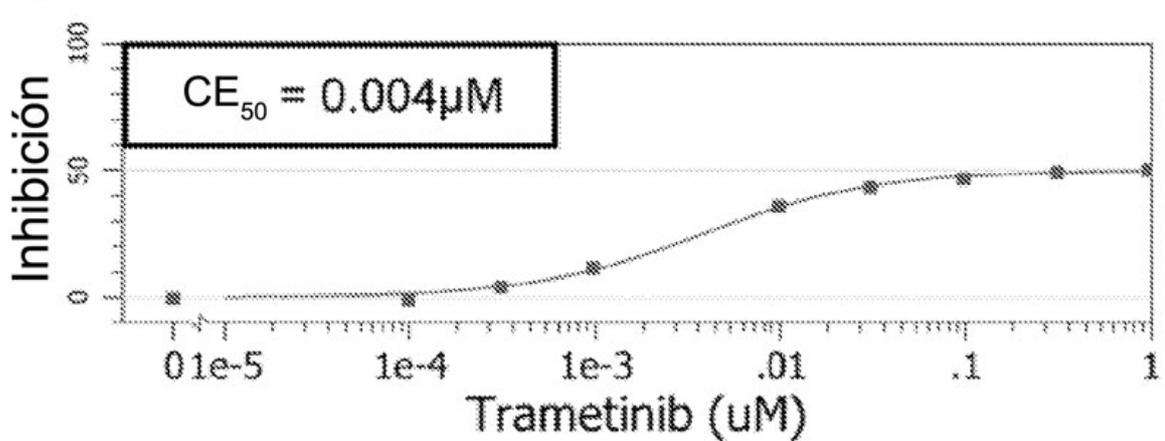
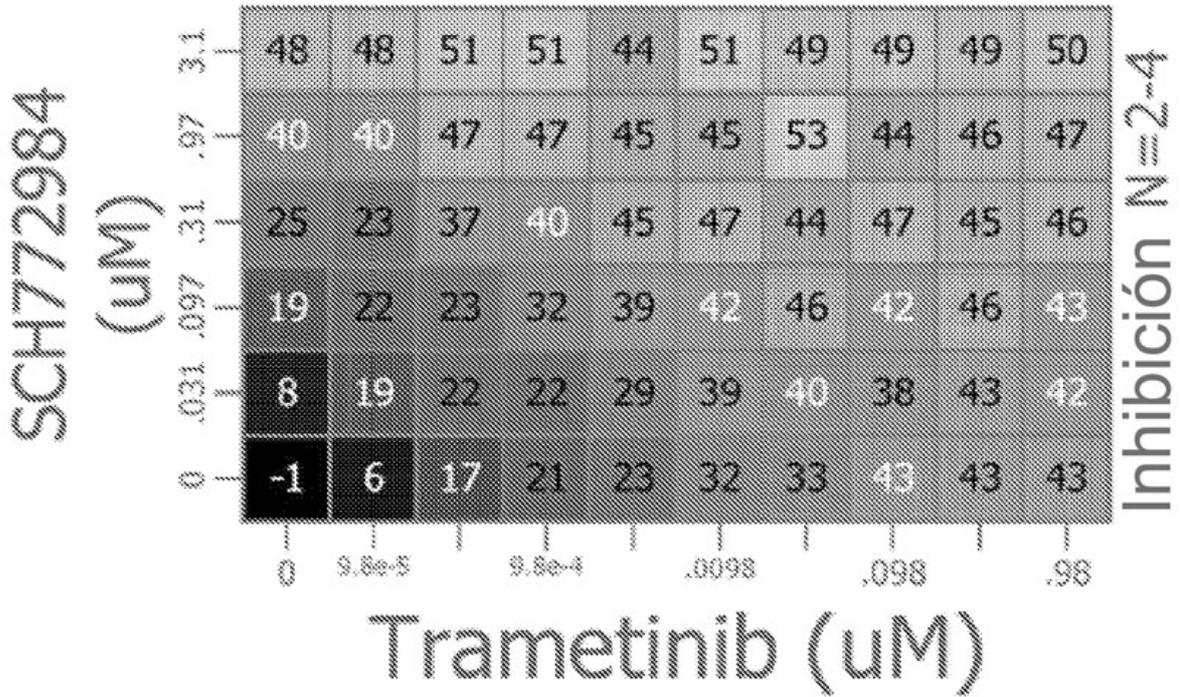


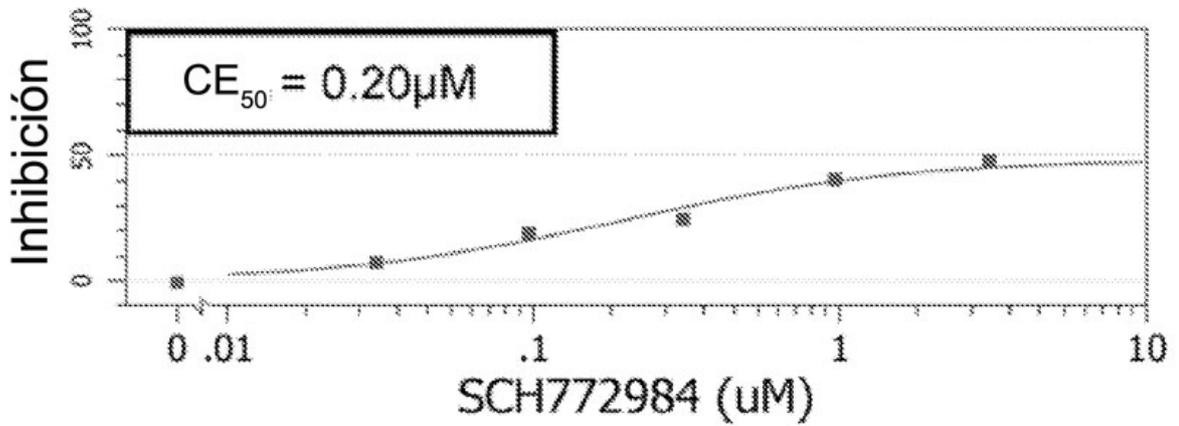


FIG. 50

A



B



C

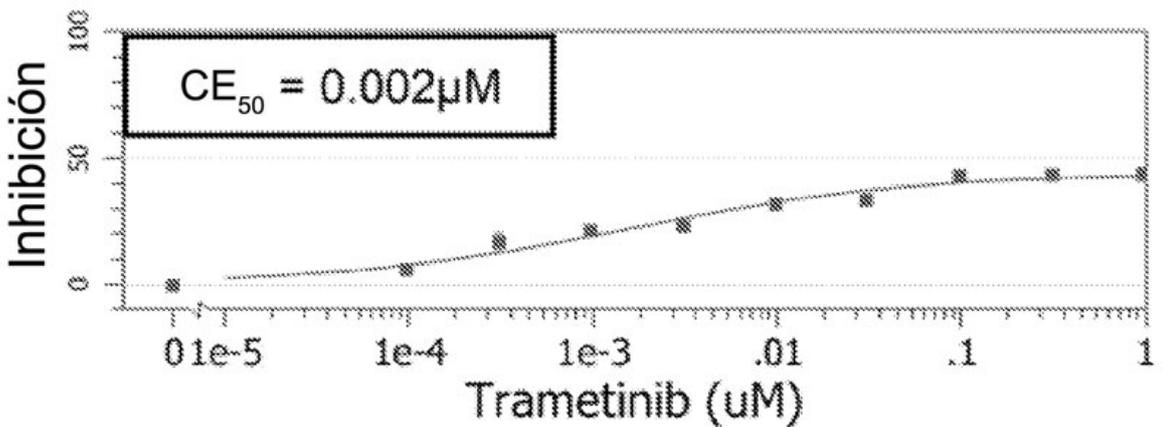
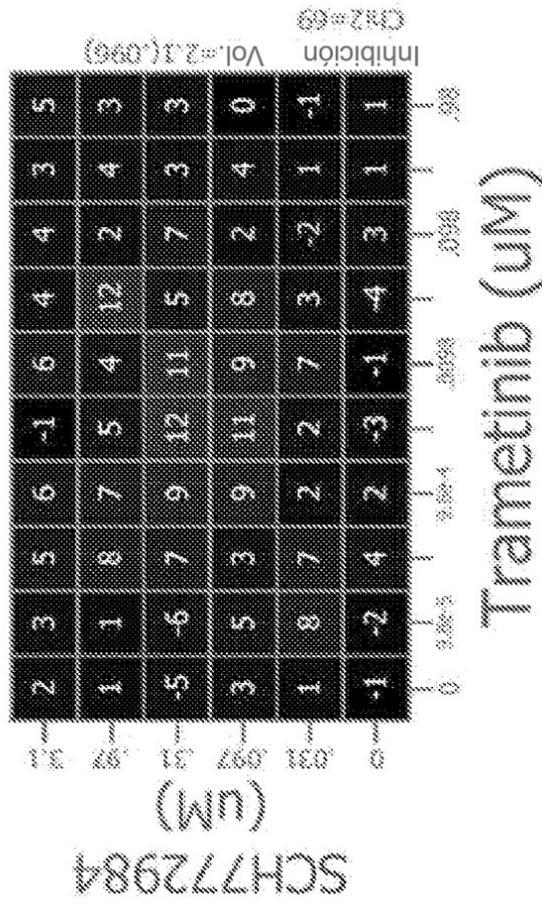


FIG. 50, Cont.

D



E

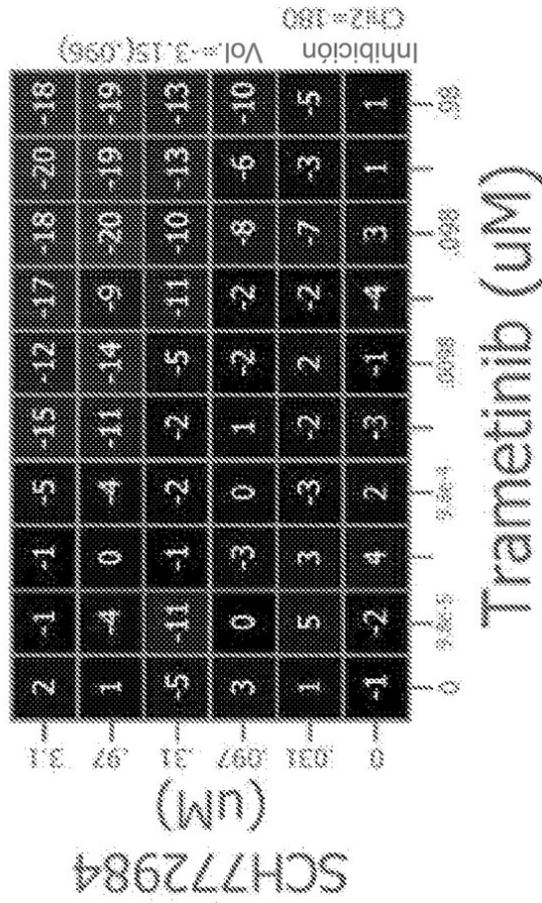


FIG. 51

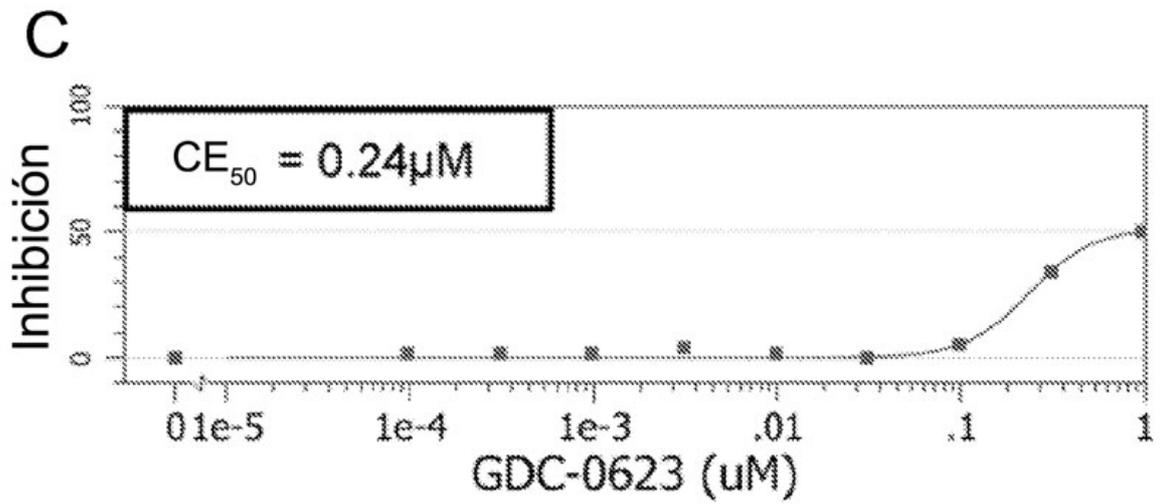
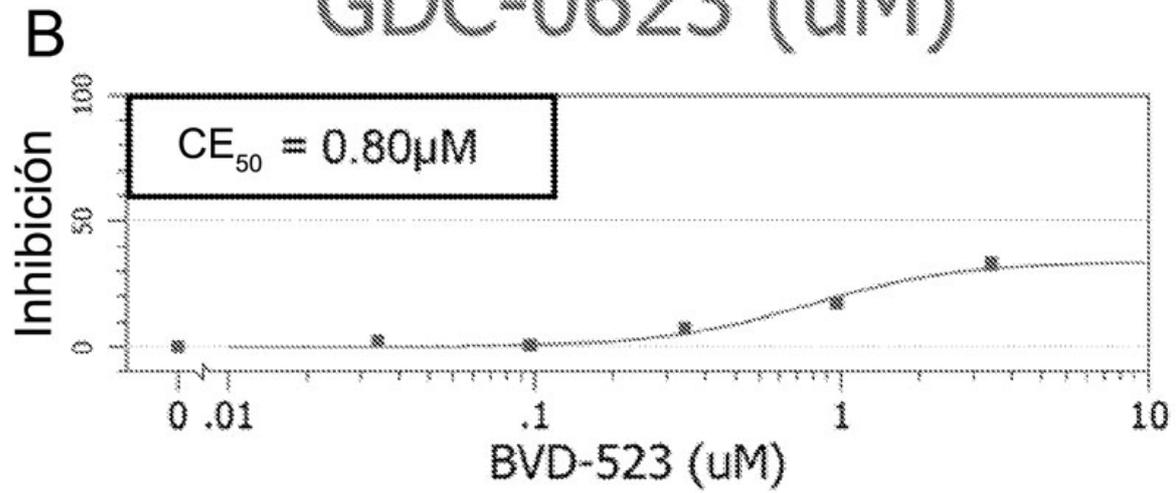
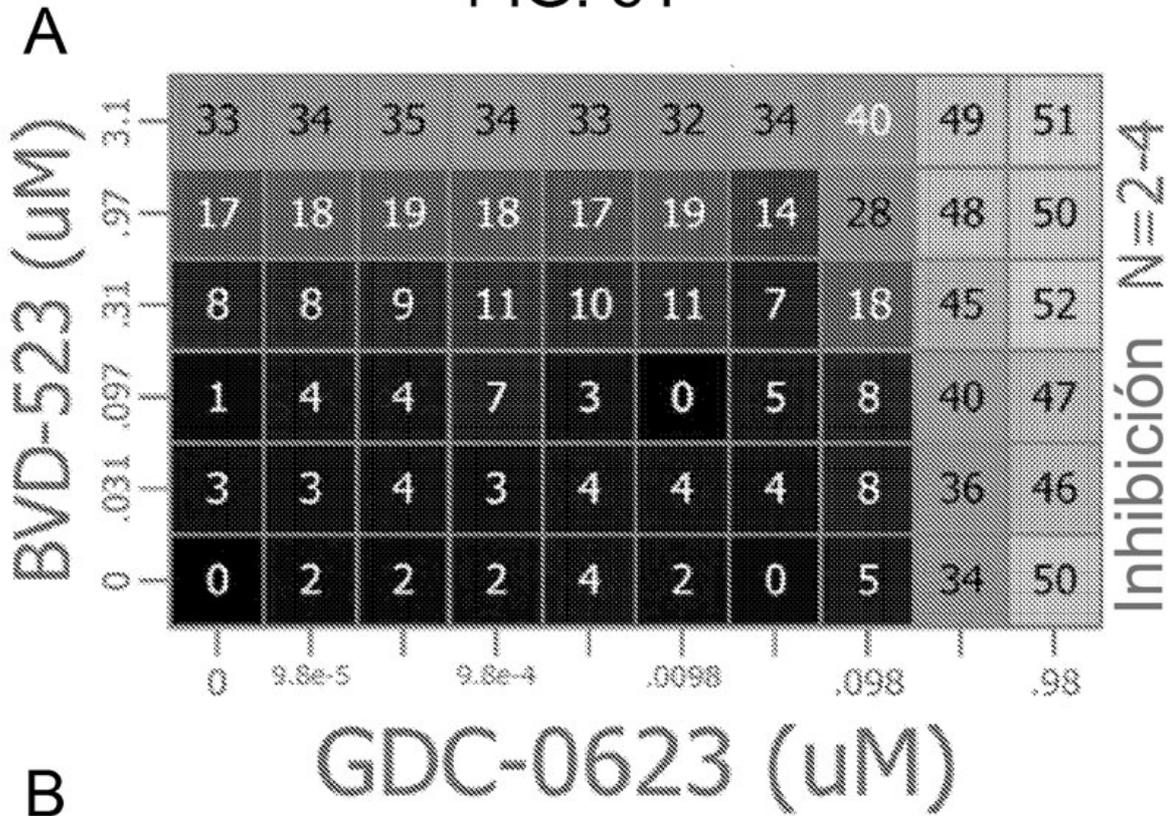
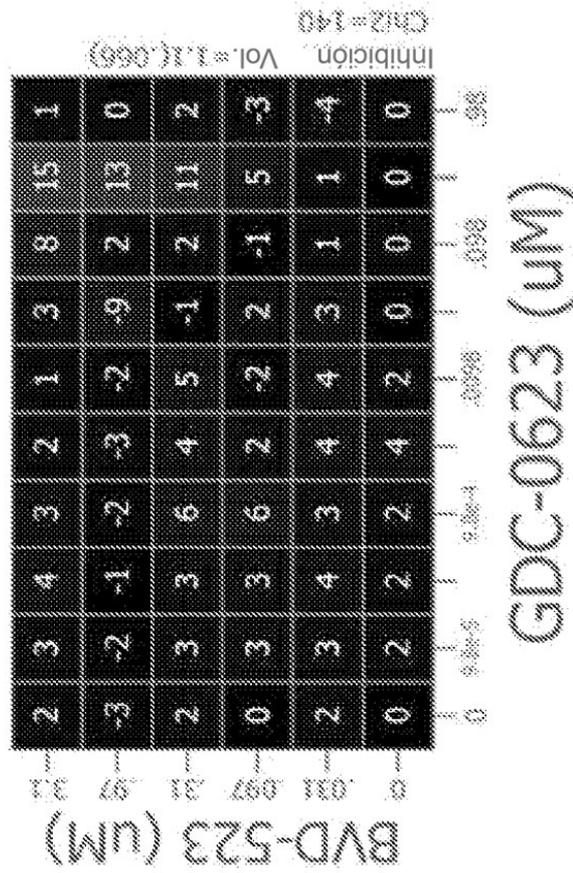


FIG. 51, Cont.

D



E

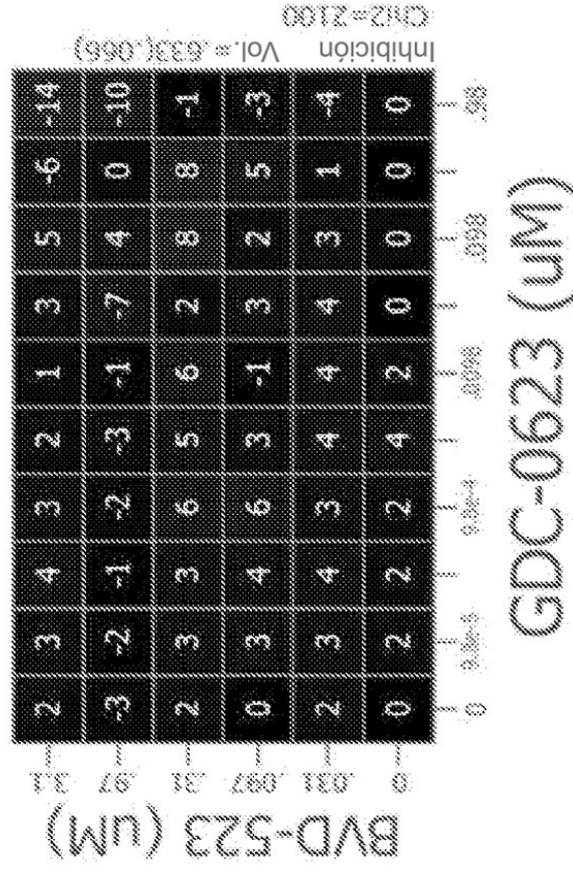
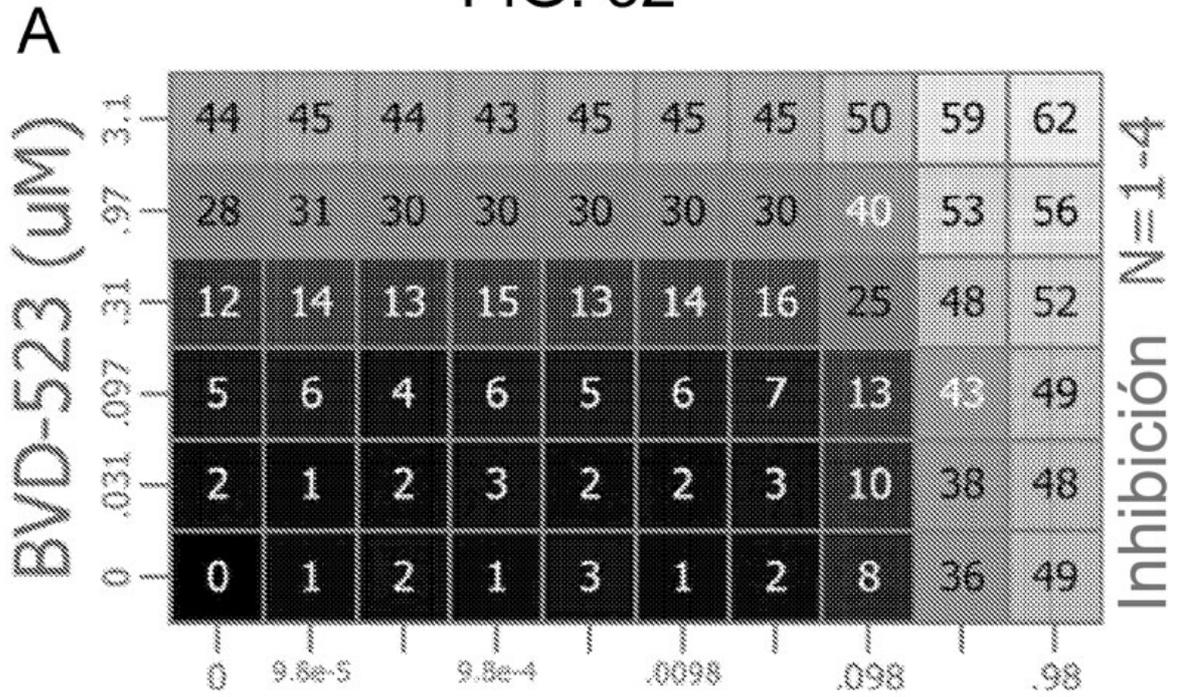


FIG. 52



GDC-0623 (uM)

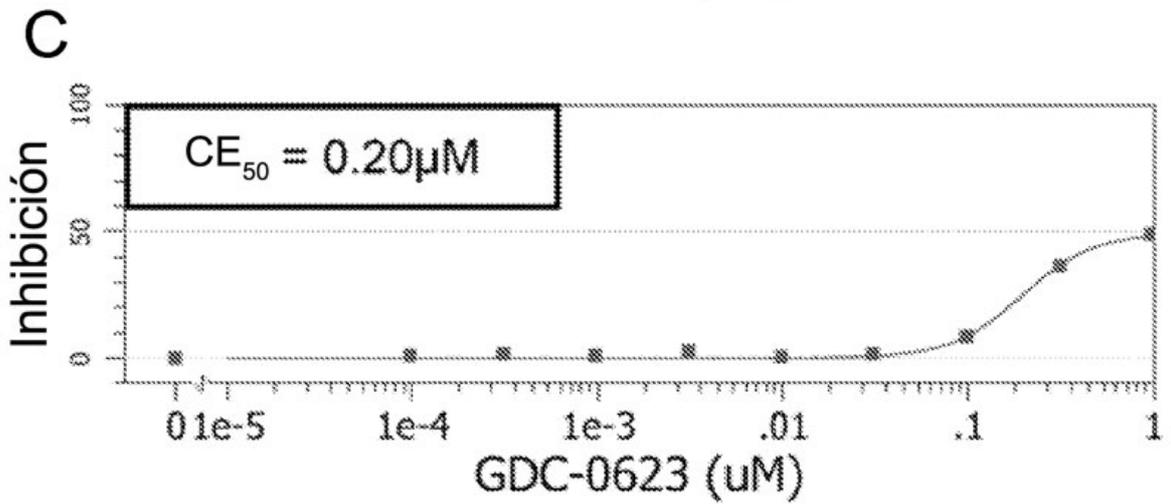
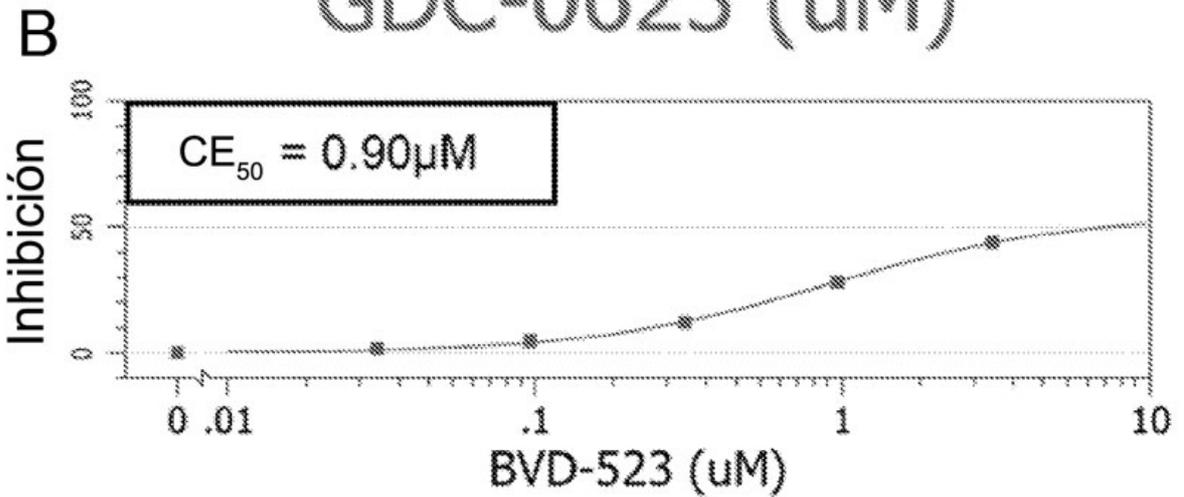
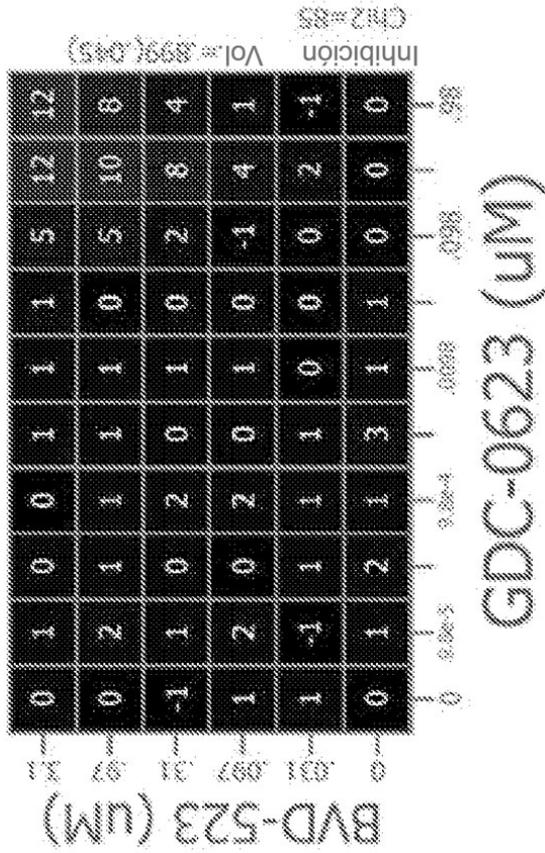


FIG. 52, Cont.

D



E

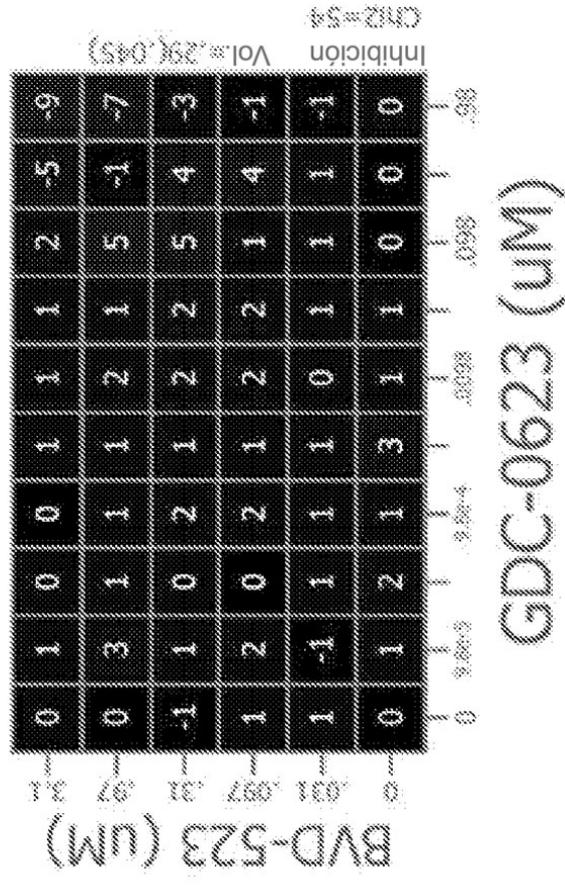


FIG. 53

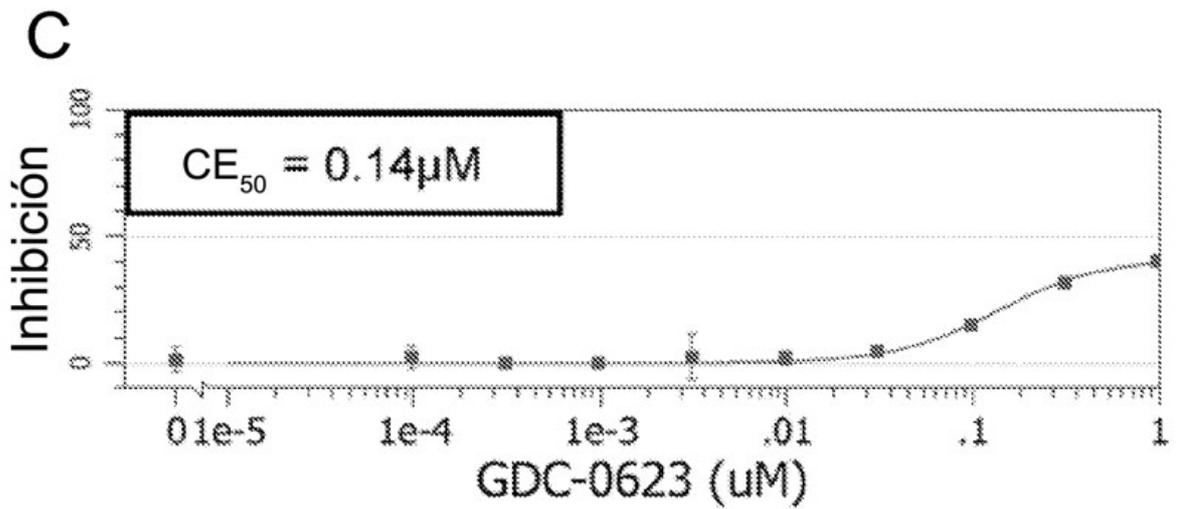
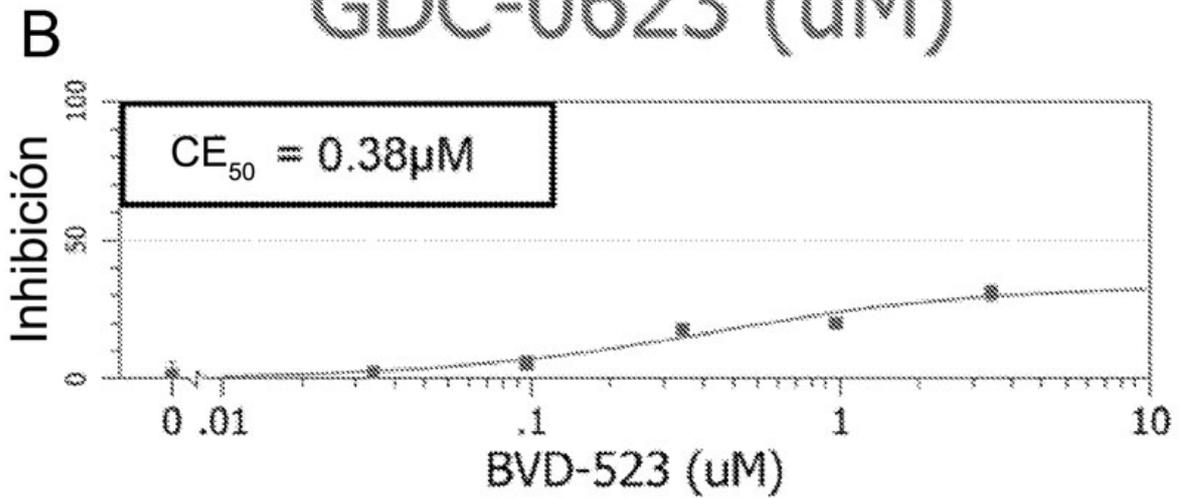
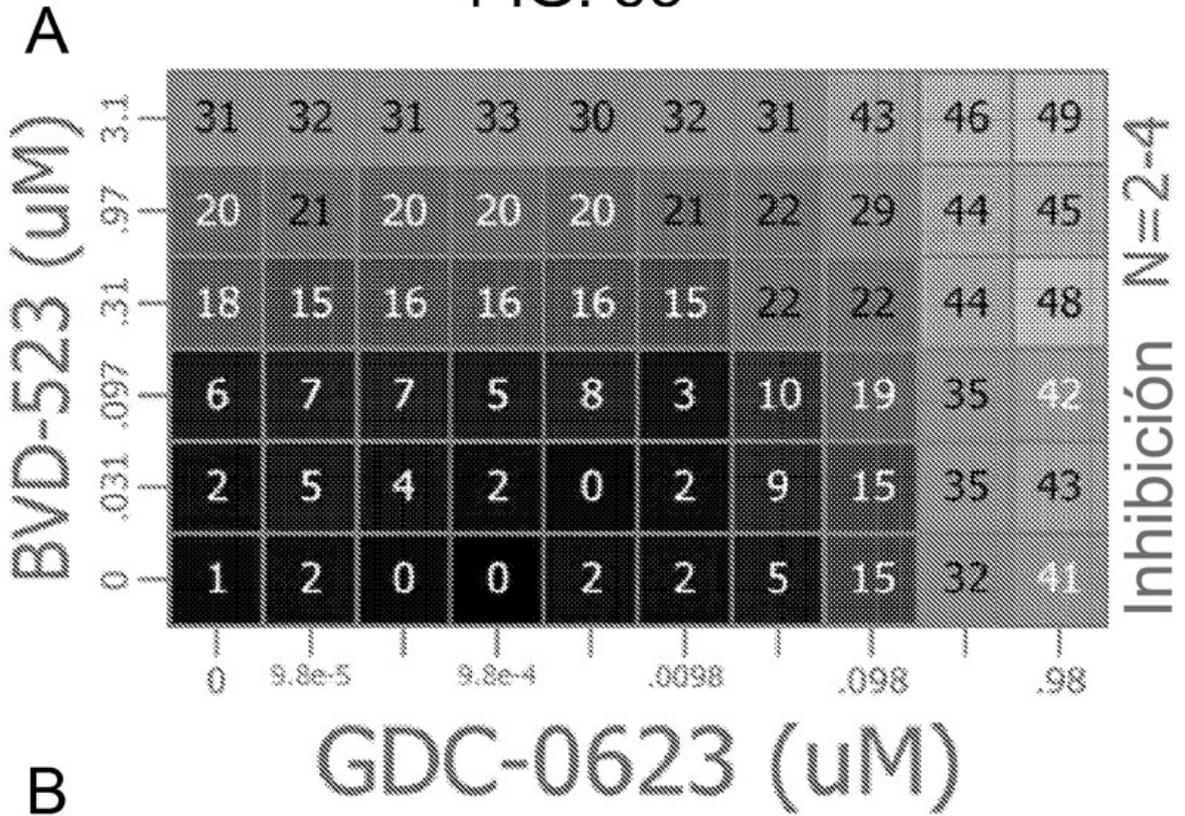
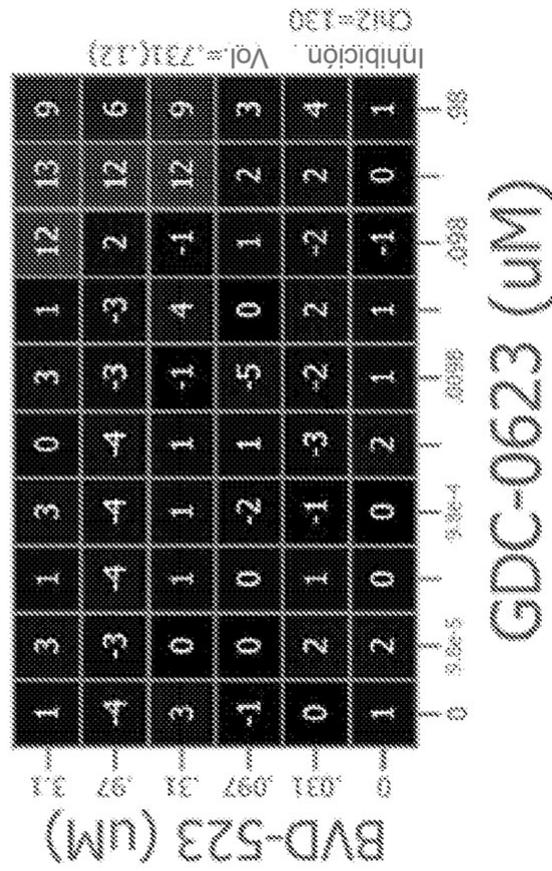


FIG. 53, Cont.

D



E

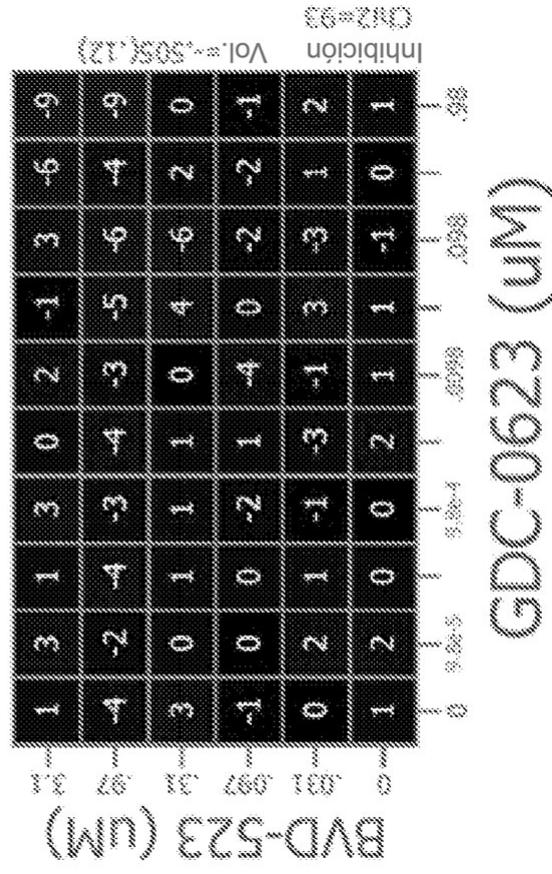


FIG. 54

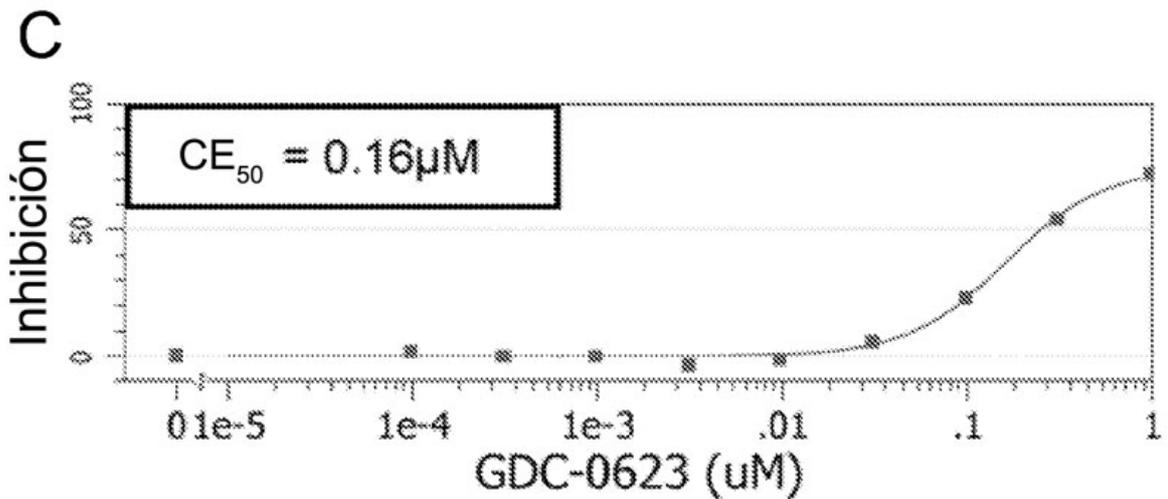
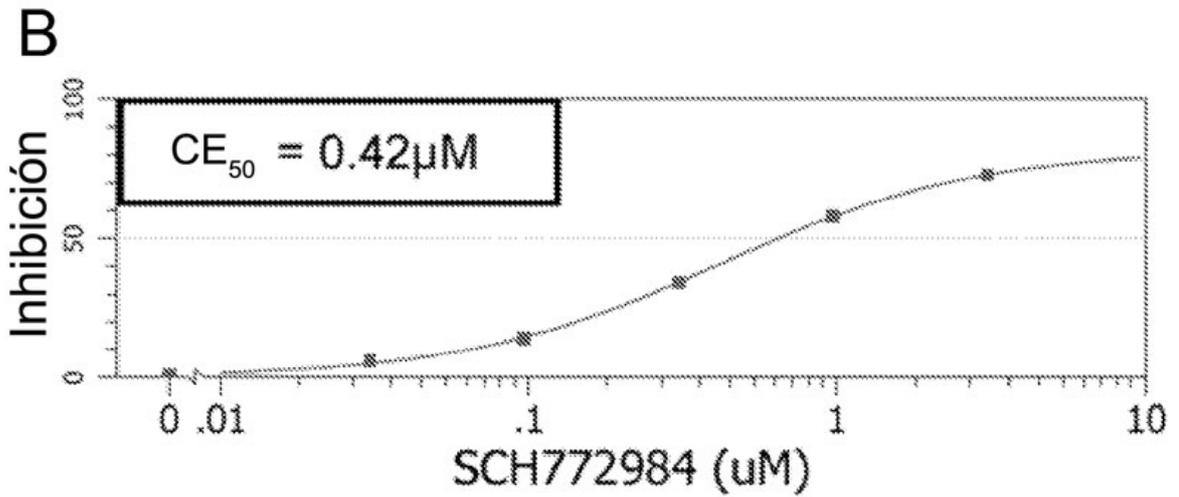
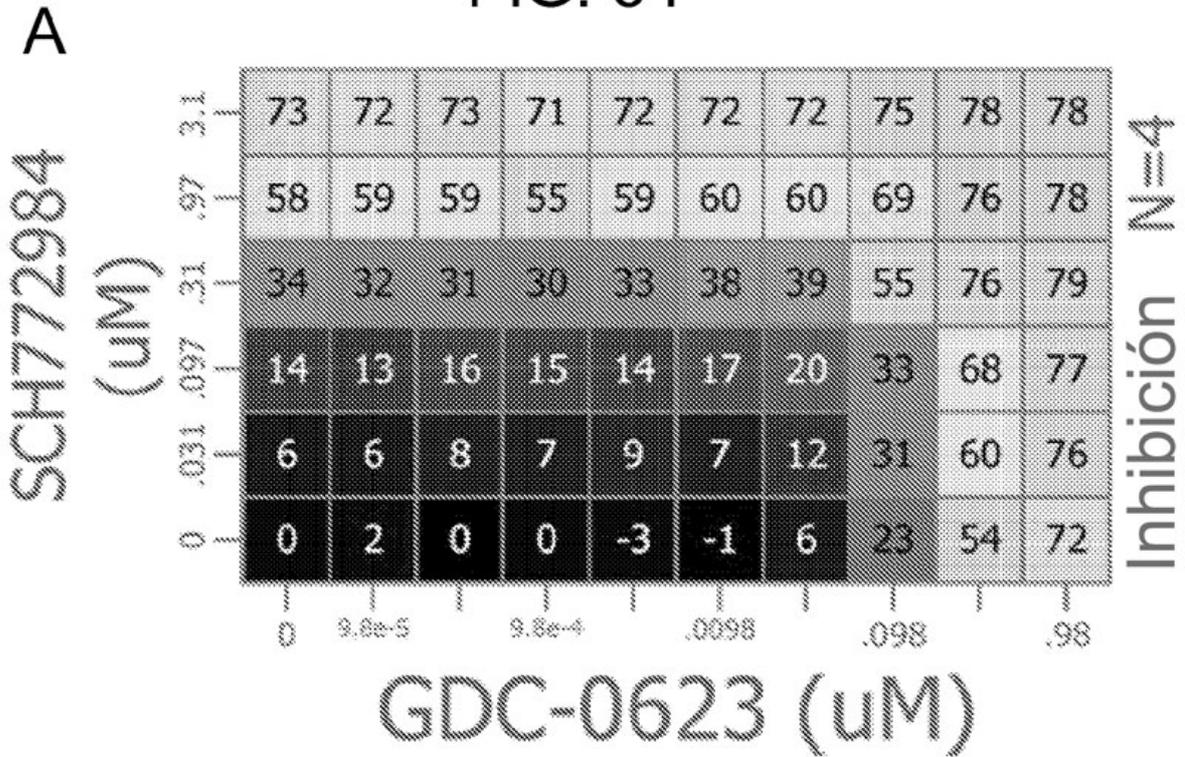


FIG. 54, Cont.

D

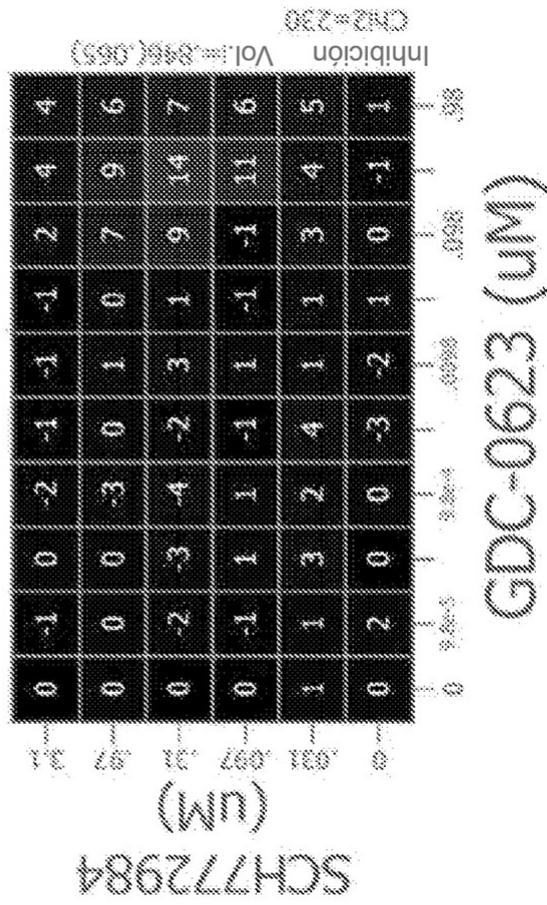


FIG. 55

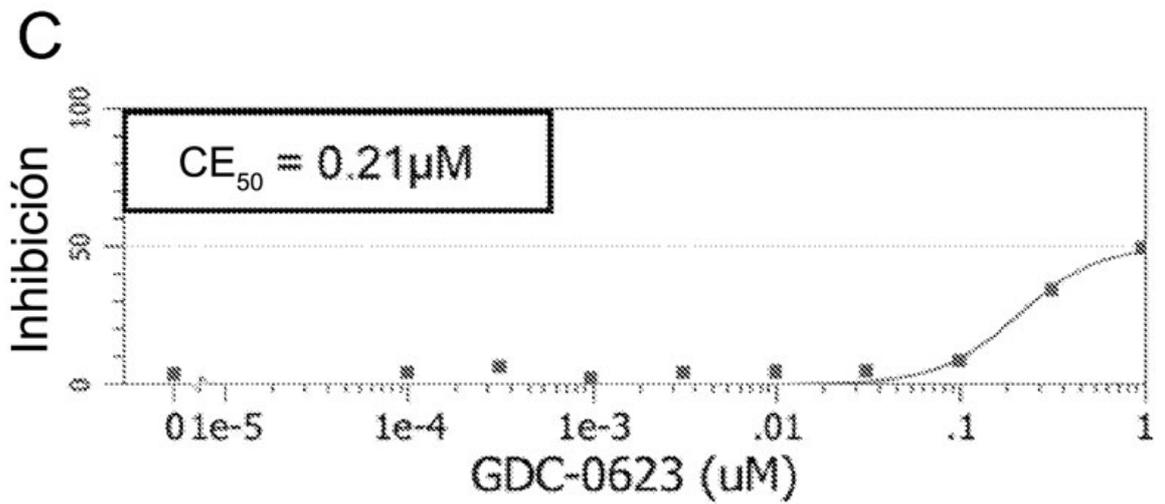
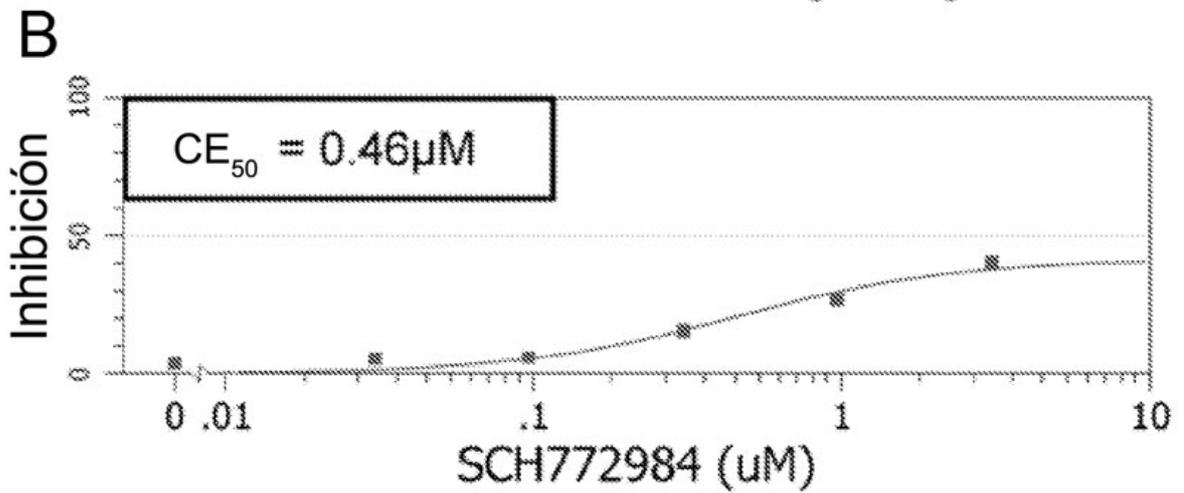
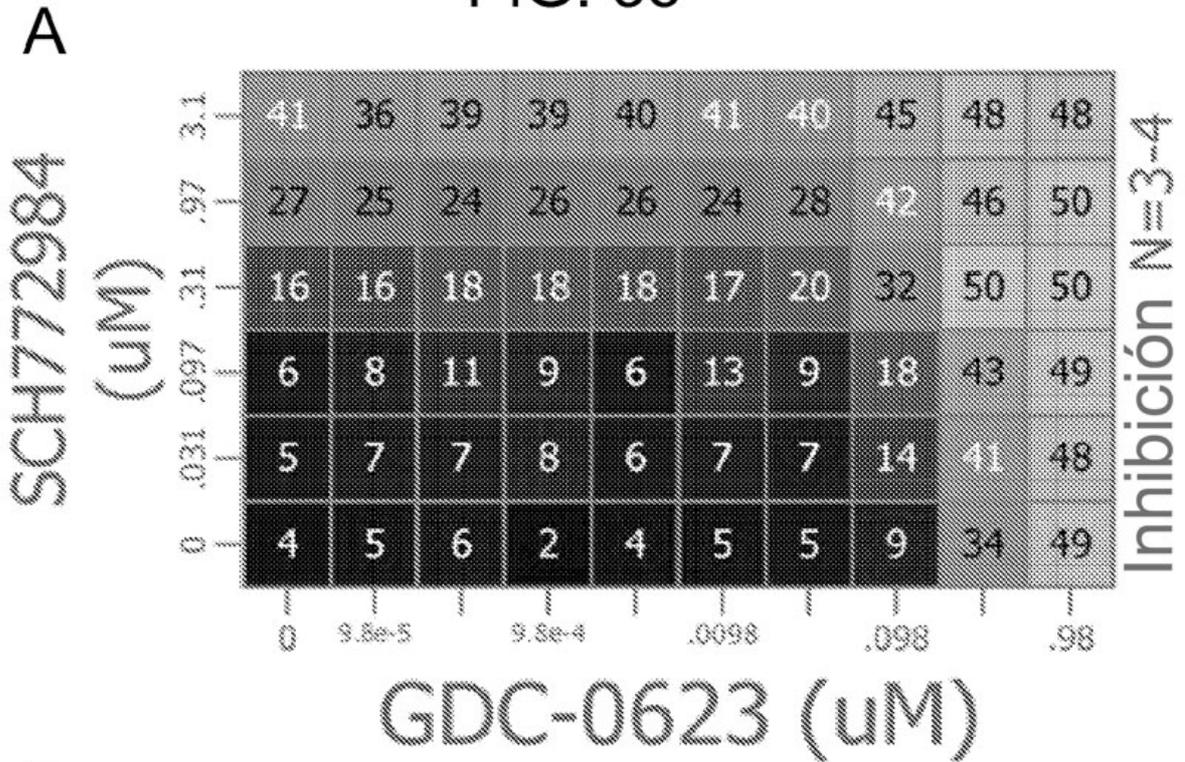
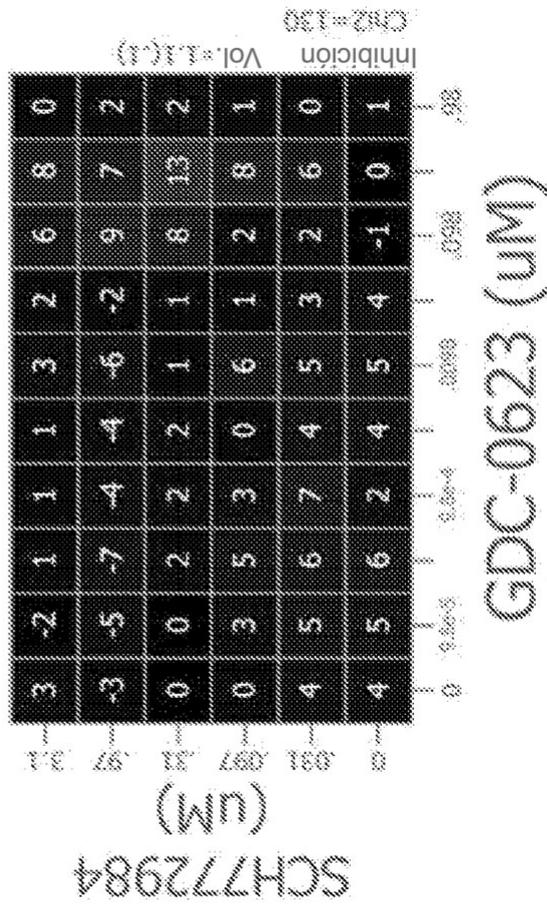


FIG. 55, Cont.

D



E

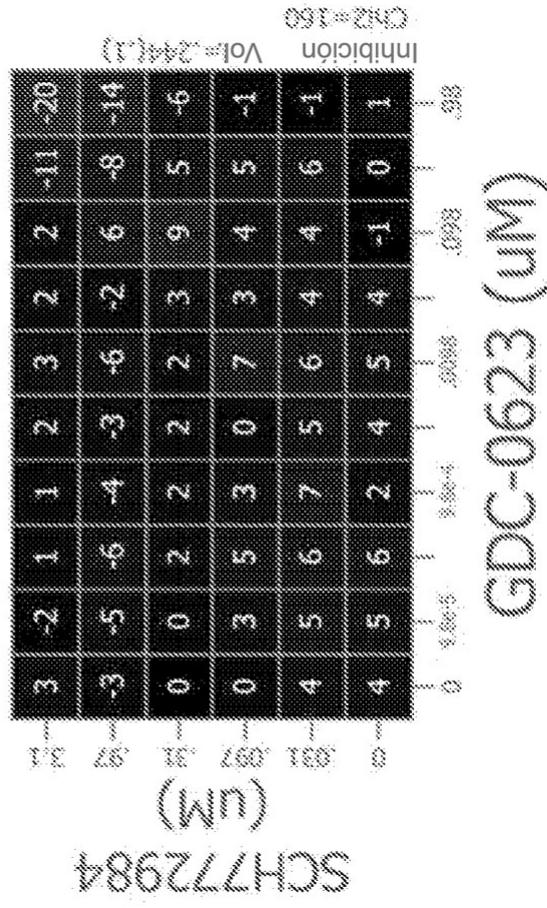


FIG. 56

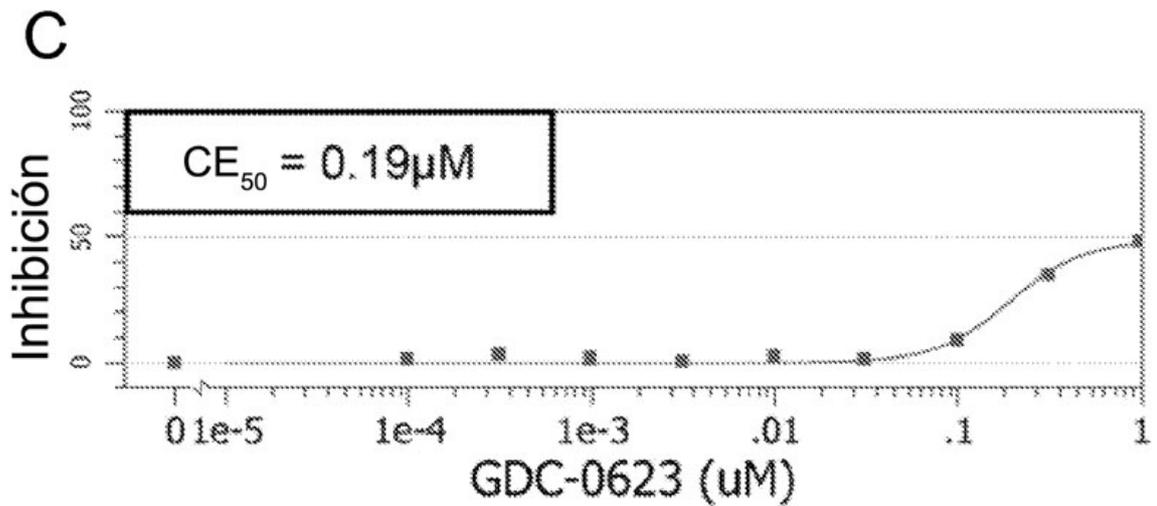
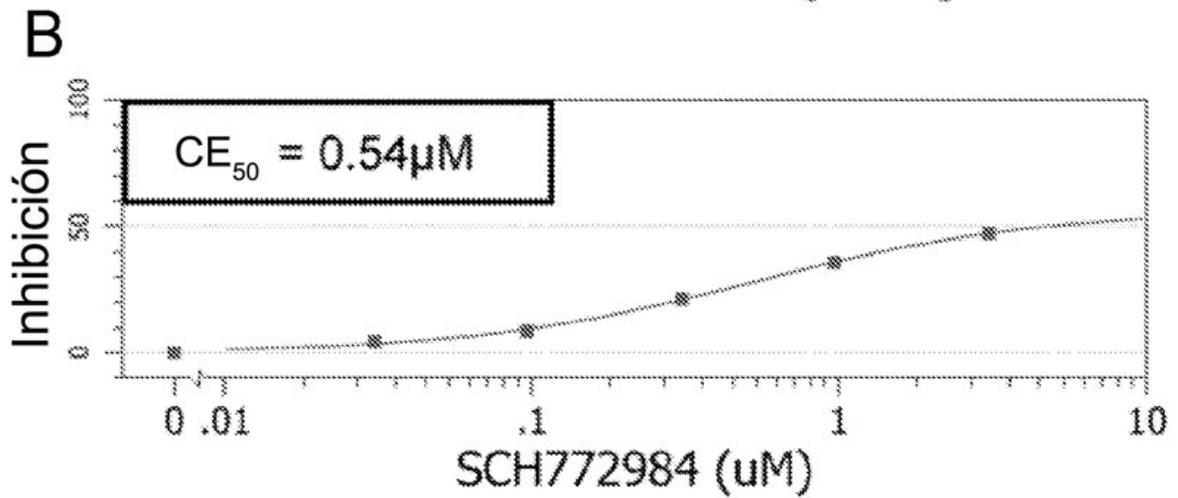
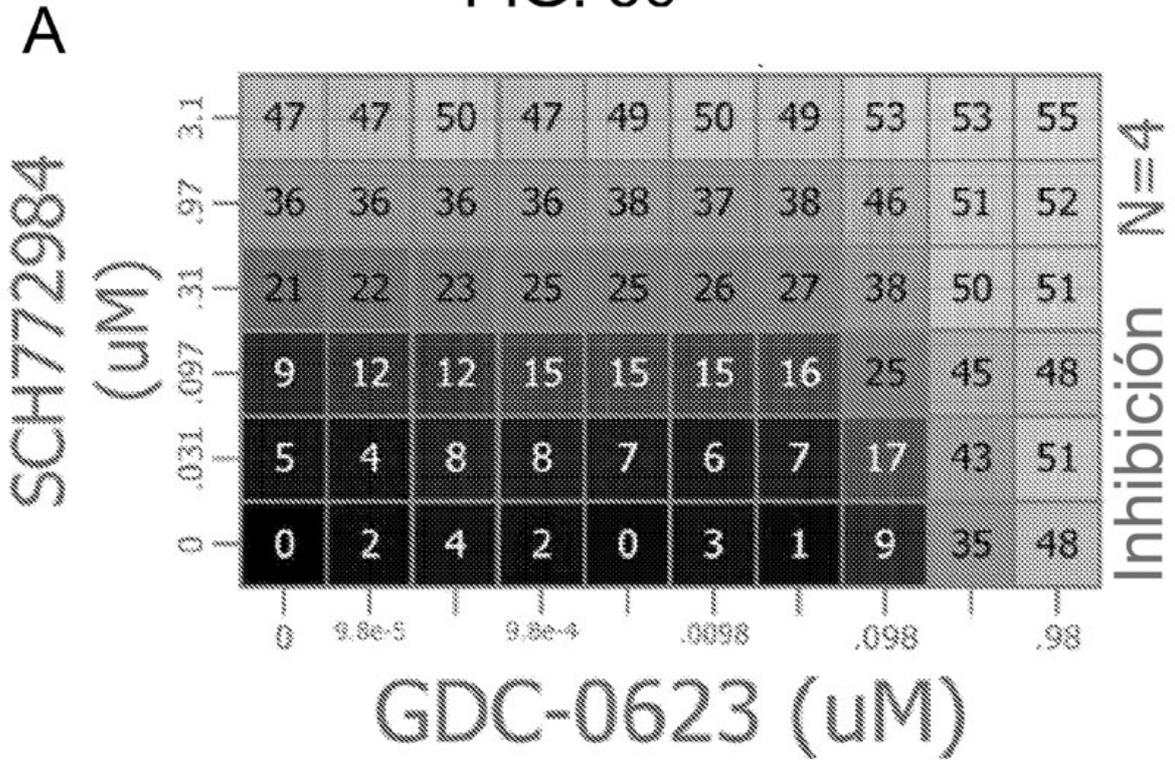
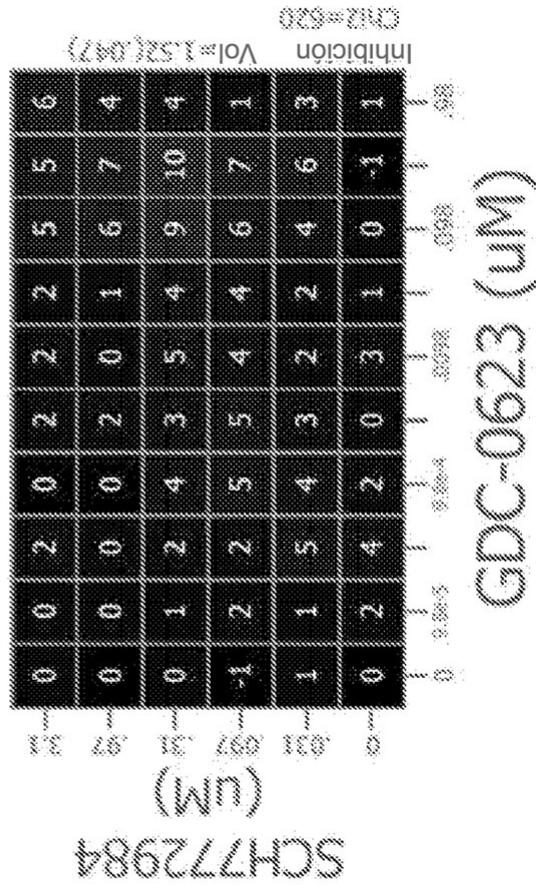


FIG. 56, Cont.

D



E

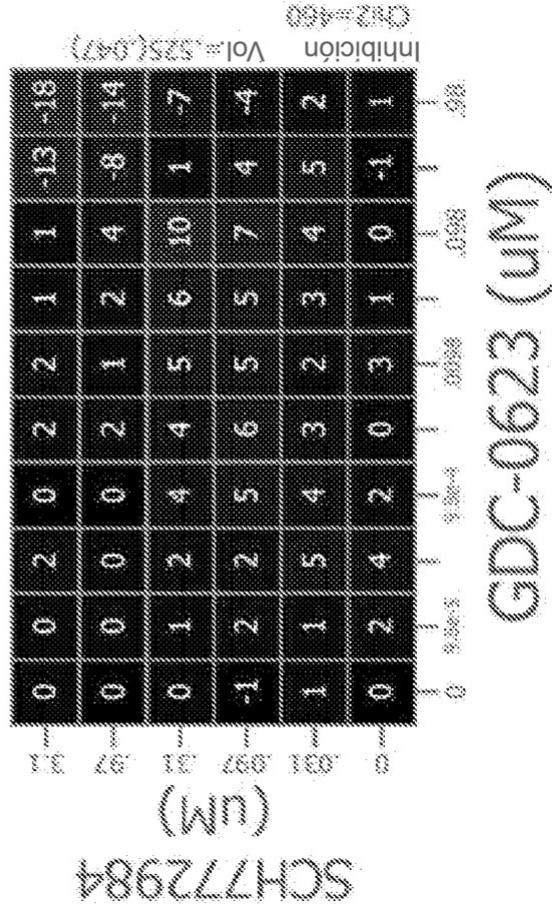
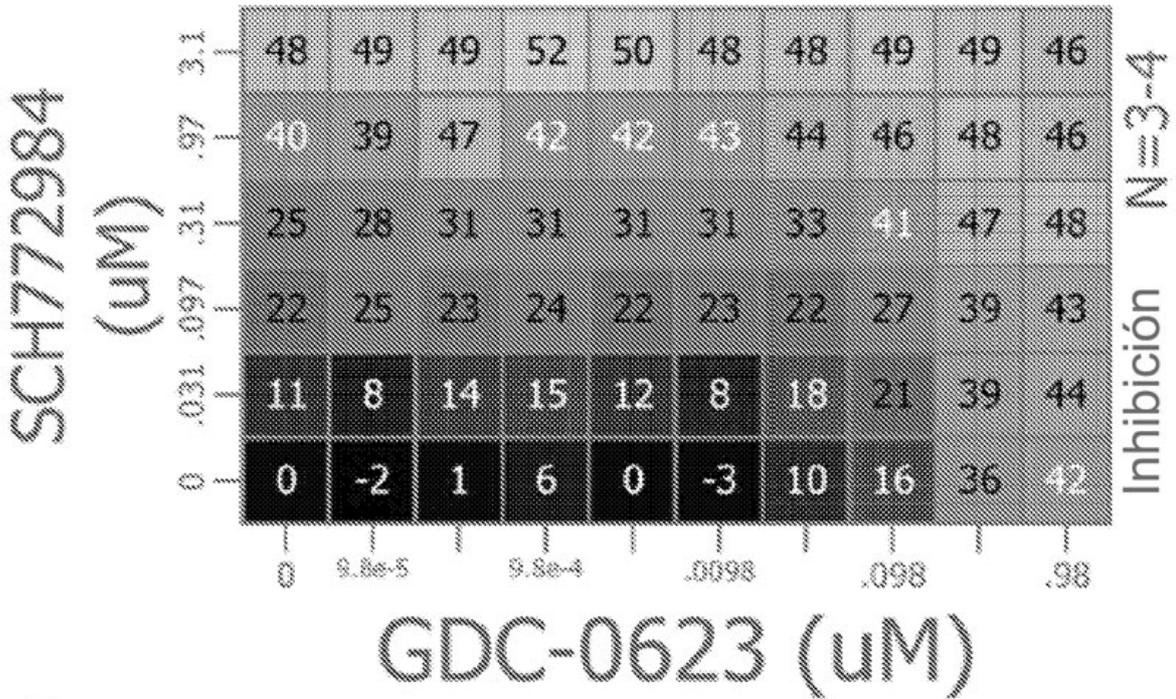
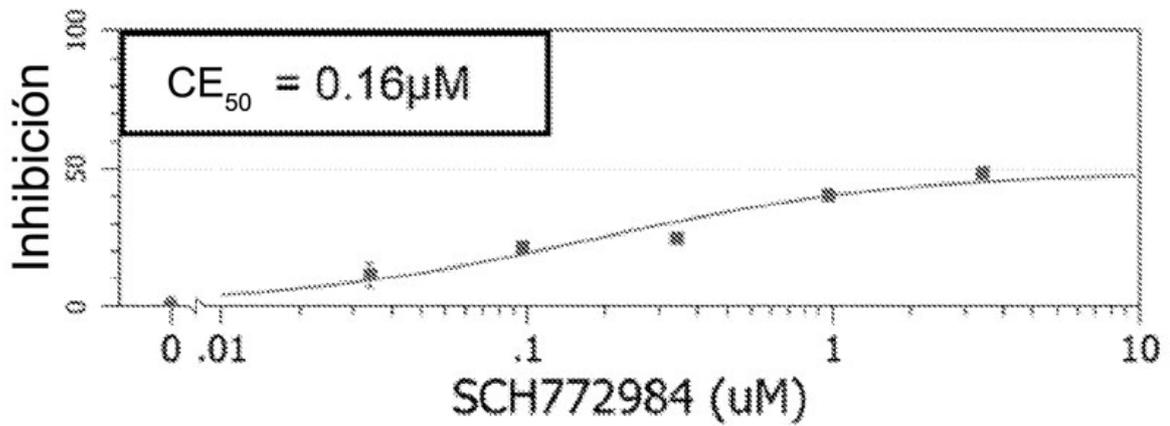


FIG. 57

A



B



C

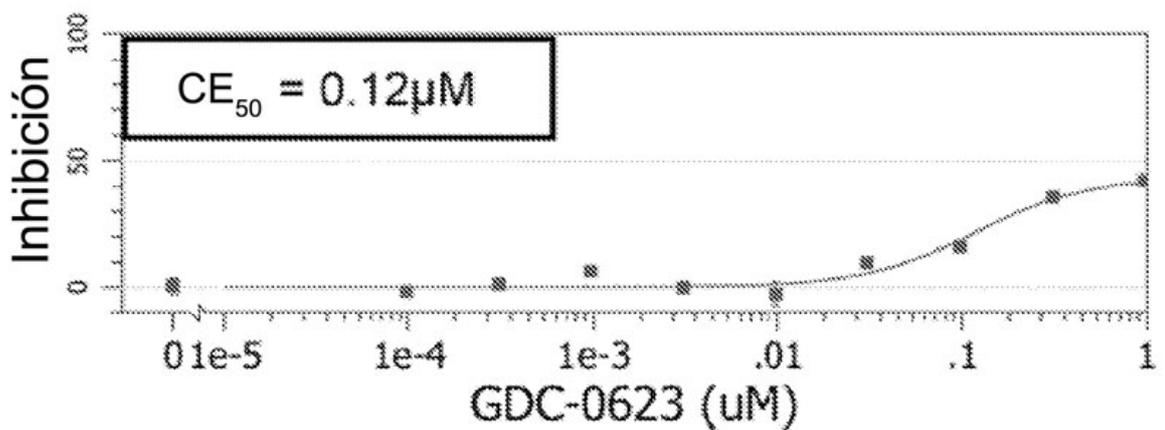
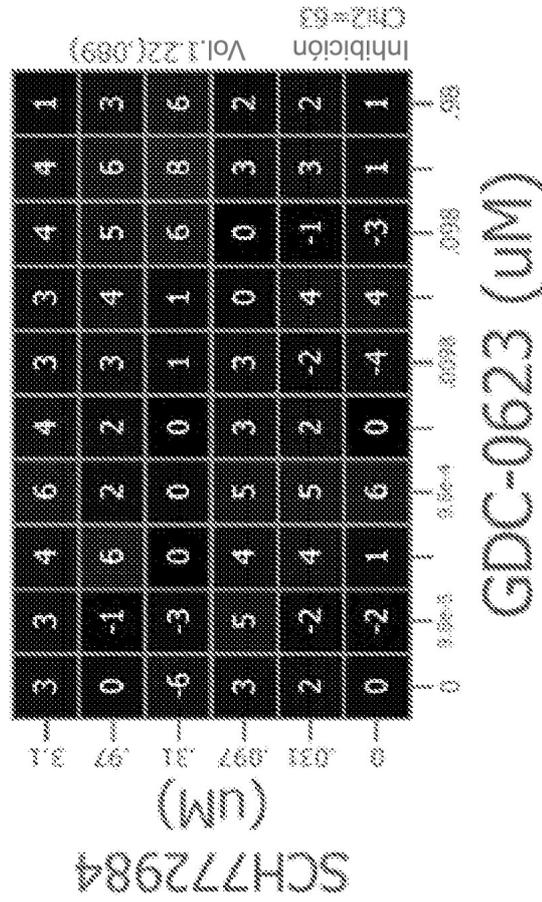


FIG. 57, Cont.

D



E

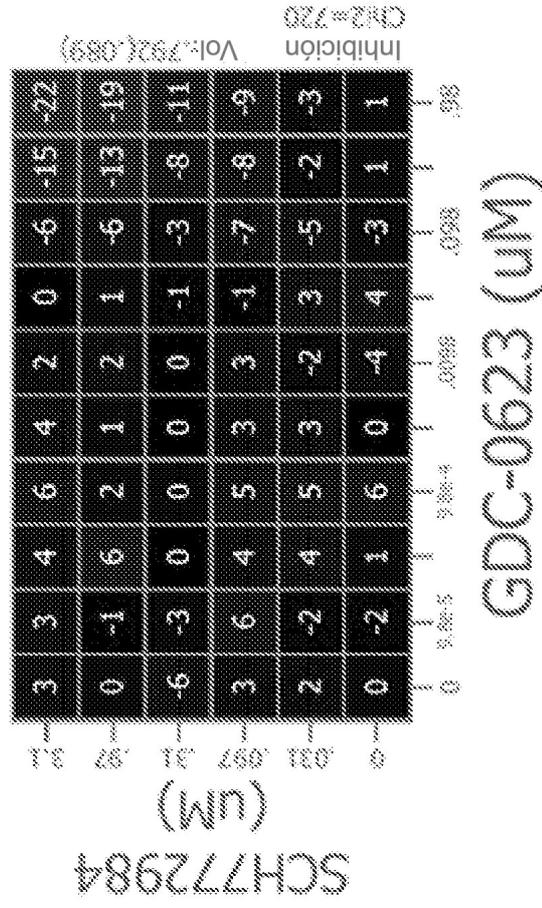
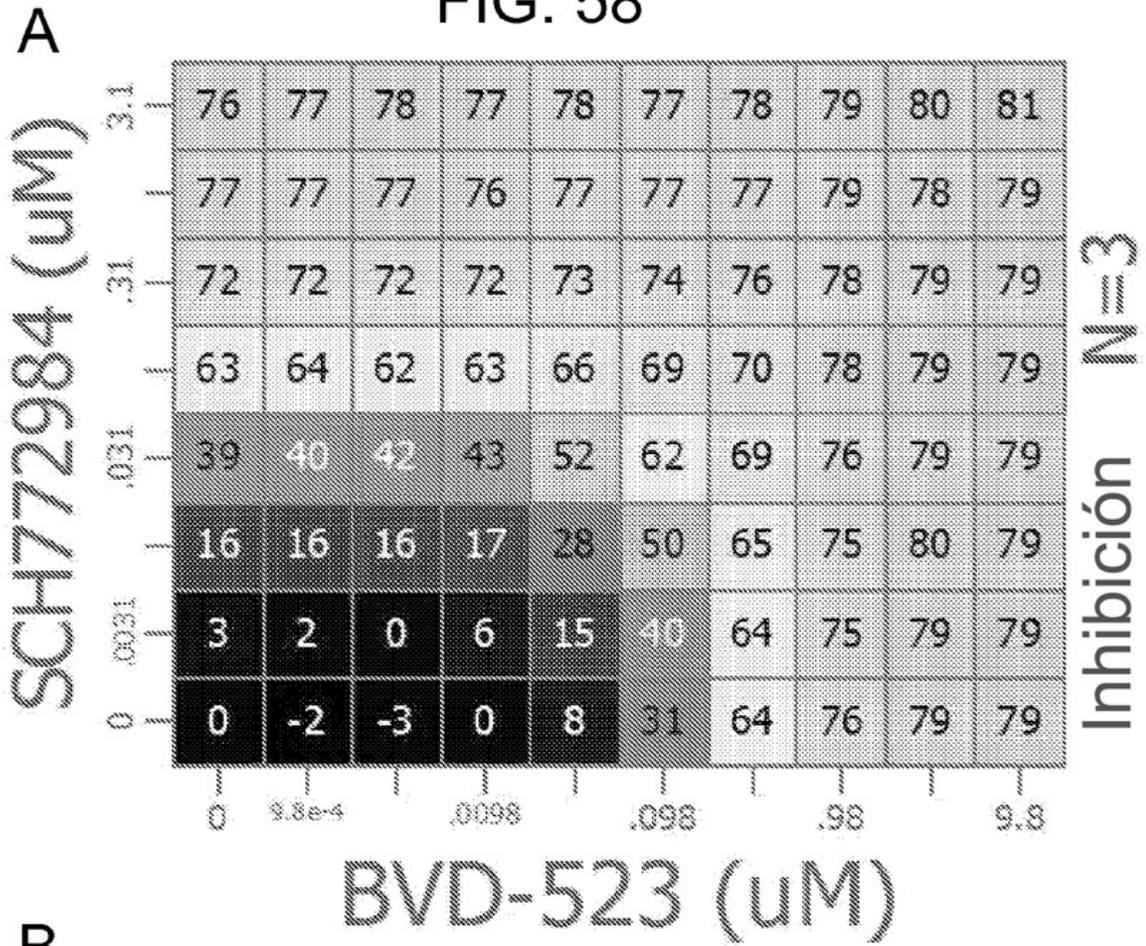
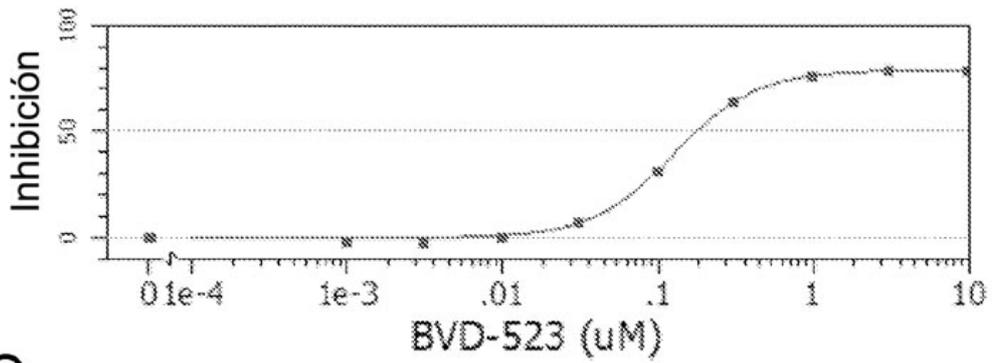


FIG. 58



**B**



**C**

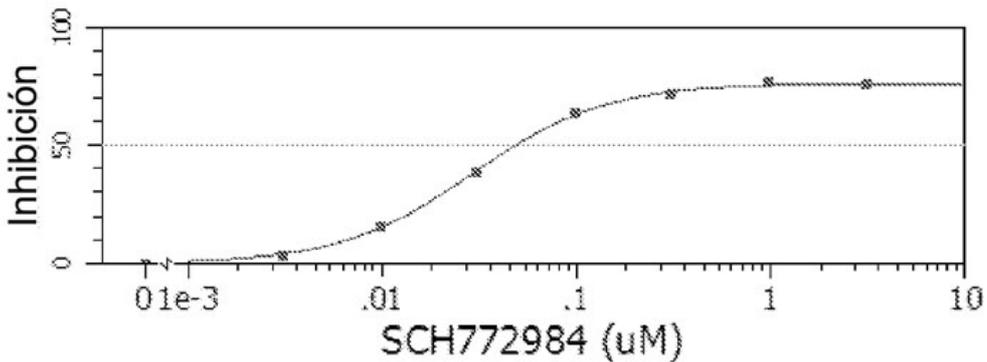
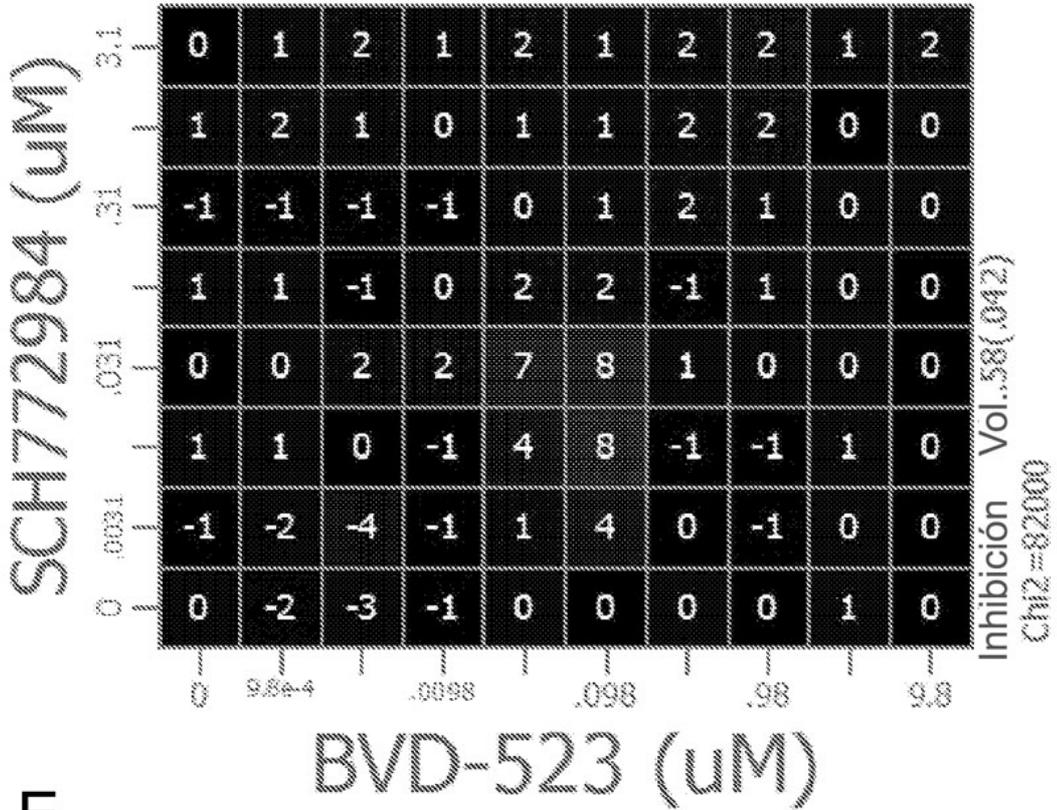


FIG. 58, Cont.

D



E

