

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 061**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4184 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011** **E 11705795 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016** **EP 2538943**

54 Título: **Mutaciones de BRAF que confieren resistencia a inhibidores de BRAF**

30 Prioridad:

25.02.2010 US 308275 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2016

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02115-5450, US

72 Inventor/es:

GARRAWAY, LEVI y
EMERY, CAROLINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 576 061 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

Mutaciones de BRAF que confieren resistencia a inhibidores de BRAF

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad del documento USSN 61/308.275, presentado el 25 de febrero de 2010.

Apoyo del Gobierno

La presente invención se realizó con apoyo del Gobierno bajo la Subvención n.º K08 CA115927, otorgada por el Instituto Nacional de la Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Antecedentes de la invención

El tratamiento del cáncer es uno de los mayores retos de la medicina moderna. Aunque los agentes quimioterapéuticos son típicamente un medio eficaz para tratar o reducir los síntomas asociados con el cáncer, en algunos casos, durante el tratamiento se manifiesta resistencia a uno o más agentes quimioterapéuticos. Como resultado, un agente quimioterapéutico dado puede volverse ineficaz en ciertos individuos. Los mecanismos moleculares responsables del desarrollo de resistencia en diversos tipos de cáncer apenas se entienden. El esclarecimiento de los mecanismos que subyacen a la resistencia a agentes específicos es esencial para descubrir enfoques de tratamiento que eviten eficazmente la resistencia farmacológica.

Heidorn *et al* (2010) Cell, Vol. 140, número 2 pp. 209-221 enseña un mecanismo de tumorigénesis mediada por BRAF sin actividad quinasa en presencia de RAS oncogénico.

El documento WO2008/079903 enseña compuestos activos en proteína quinasas, así como métodos para usar dichos compuestos para tratar enfermedades y afecciones asociadas con actividad aberrante de proteína quinasas.

Emery *et al* (2009) PNAS, Vol. 106, n.º 48, pp. 20411-20416 enseña una investigación sobre la relevancia clínica de la dependencia de MEK en melanoma secuenciando en paralelo de forma masiva clones resistentes generados a partir de una exploración de mutagénesis aleatoria de *MEK1 in vitro*, así como tumores obtenidos de pacientes con recaída después del tratamiento con AZD6244, un inhibidor de EK alostérico.

Whittaker *et al* (2010) Sci Transl Med, Vol. 2, n.º 35, p35RA41 enseña la generación de versiones resistentes a fármacos de BRAF oncogénico mutando el resto guardián.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a resistencia mediada por mutación al tratamiento quimioterapéutico del cáncer. En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a mutaciones identificadas en polipéptidos de RAF (por ejemplo, polipéptidos de BRAF), y en moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de RAF. Estas mutaciones confieren resistencia a inhibidores de RAF actualmente en uso terapéutico. La identificación de estas mutaciones permite el desarrollo de inhibidores de RAF de segunda generación que muestran actividad contra un polipéptido de RAF que contiene una o más mutaciones, tales como las mutaciones descritas en el presente documento. Dichos inhibidores de RAF de segunda generación son útiles en muchas aplicaciones clínicas y terapéuticas, incluyendo el tratamiento del cáncer.

En consecuencia, la invención presenta, en un primer aspecto, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de BRAF mutante que tiene actividad de BRAF, en el que dicho polipéptido de BRAF mutante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido de BRAF V600E mostrado como SEQ ID NO: 4, confiriendo la al menos una sustitución de aminoácido resistencia a uno o más inhibidores de BRAF en el polipéptido de BRAF mutante, el inhibidor de BRAF seleccionado de RAF-265 o PLX4720 en el que la al menos una sustitución de aminoácido se produce en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En realizaciones ejemplares, la al menos una sustitución de aminoácido es una o más de las siguientes: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

En una realización del aspecto anterior, el polipéptido de BRAF mutante tiene de una a cinco sustituciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido de BRAF V600E. En realizaciones ejemplares, el polipéptido de BRAF mutante tiene una sustitución de aminoácido. En otra realización ejemplar, el polipéptido de BRAF mutante es un BRAF que comprende una sustitución en una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 4: V528, T521, y/o P686. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el inhibidor de BRAF es RAF-265.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos de RAF mutantes pueden insertarse en un vector de expresión y expresarse en una célula hospedadora. En consecuencia, en otro aspecto, la invención presenta un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico expuesta en el presente documento. En otro aspecto, la invención presenta una célula hospedadora que comprende el vector de expresión anterior. En otro aspecto, la invención presenta un método para producir un polipéptido de BRAF mutante, que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que codifica un polipéptido de BRAF mutante, de modo que se produzca un polipéptido de BRAF mutante por la célula.

En otras realizaciones, la invención presenta polipéptidos de BRAF mutantes aislados, en los que los polipéptidos de BRAF mutantes comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido de BRAF V600E mostrado como SEQ ID NO: 4, confiriendo la al menos una sustitución de aminoácido resistencia a uno o más inhibidores de BRAF en el polipéptido de BRAF mutante, el inhibidor de BRAF seleccionado de RAF-265 o PLX4720 en el que la al menos una sustitución de aminoácido sucede en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En realizaciones preferidas, los polipéptidos de BRAF mutantes aislados tienen una actividad de un polipéptido de BRAF de tipo silvestre. En realizaciones ejemplares, la al menos una sustitución de aminoácido se selecciona de las siguientes: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F. En algunas realizaciones, el polipéptido de BRAF mutante tiene de una a cinco sustituciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido de BRAF V600E. En enseñanzas ejemplares, el polipéptido de BRAF mutante tiene una sustitución de aminoácido en comparación con el polipéptido de BRAF de tipo silvestre. En otras realizaciones ejemplares del aspecto anterior, el inhibidor de BRAF es RAF-265.

En otro aspecto, la invención presenta un método para identificar un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer, que comprende (a) proporcionar una composición de ensayo que comprende un polipéptido de BRAF mutante de la invención y un sustrato de BRAF; (b) poner en contacto la composición de ensayo con un compuesto de ensayo en condiciones que permitan la fosforilación del sustrato de BRAF en ausencia del compuesto de ensayo; y (c) determinar el efecto del compuesto en la fosforilación del sustrato de BRAF, en el que la modulación negativa de la fosforilación del sustrato de BRAF en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, la composición de ensayo es un extracto celular.

En otro aspecto, la invención presenta un método para identificar un compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación, que comprende (a) proporcionar una composición de ensayo que comprende un polipéptido de BRAF mutante de la invención y un sustrato de BRAF; (b) poner en contacto la composición de ensayo con un compuesto de ensayo en condiciones que permitan la fosforilación del sustrato de BRAF en ausencia del compuesto de ensayo; y (c) determinar el efecto del compuesto en la fosforilación del sustrato de BRAF, en el que la modulación negativa de la fosforilación del sustrato de BRAF en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación. En algunas realizaciones, la composición de ensayo es un extracto celular.

En otro aspecto, la invención presenta un método para identificar un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer, que comprende (a) proporcionar una célula que comprende un polipéptido de BRAF mutante de la invención; (b) poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo; y (c) determinar el efecto del compuesto en la fosforilación de un sustrato de BRAF o en la proliferación celular, en el que la modulación negativa de la fosforilación del sustrato de BRAF o reducción en la proliferación celular en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención presenta un método para identificar un compuesto que es un inhibidor de BRAF de segunda generación que comprende proporcionar una célula que comprende un polipéptido de BRAF mutante, poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo y determinar el efecto del compuesto en la fosforilación de un sustrato de BRAF, en el que la modulación negativa de la fosforilación del sustrato de BRAF en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación.

En una realización de los aspectos anteriores, el sustrato de BRAF es MEK1 o MEK2. En una realización ejemplar, la fosforilación de MEK1 o MEK2 se determina usando un anticuerpo de MEK fosfo-específico. En otra realización ejemplar, la fosforilación de MEK1 o MEK2 se determina midiendo la fosforilación de la proteína básica de mielina (MBP). En otra realización ejemplar, la fosforilación de MEK1 o MEK2 se determina midiendo la fosforilación de ERK1 o ERK2.

En otro aspecto, la invención presenta un método para identificar un compuesto que es un inhibidor de BRAF de segunda generación, que comprende proporcionar una célula que comprende un polipéptido de BRAF mutante, poniendo en contacto la célula con un compuesto de ensayo y determinar el efecto del compuesto en la proliferación celular, en el que la reducción de la proliferación celular en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación.

En otro aspecto, la invención presenta un método de exploración basado en células para identificar un compuesto de ensayo como un inhibidor de BRAF de segunda generación, comprendiendo el método poner en contacto una célula hospedadora de la invención con un compuesto de ensayo, en el que la sensibilidad de la célula hospedadora para el compuesto de ensayo en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación. En una realización, la sensibilidad de la célula hospedadora para el compuesto de ensayo se mide usando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en un ensayo de proliferación celular, un ensayo de viabilidad celular, y un ensayo de fosforilación de MEK, en el que una reducción de la proliferación celular, viabilidad celular o fosforilación de MEK en presencia del compuesto de ensayo identifica el compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación.

Se enseña en el presente documento un método para identificar un inhibidor de BRAF de segunda generación, que comprende seleccionar un fármaco potencial usando modelización asistida por ordenador con una estructura cristalina tridimensional o en solución de un polipéptido de BRAF mutante, en el que dicho polipéptido de BRAF mutante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido de BRAF de tipo silvestre o un polipéptido de BRAF V600E, la al menos una sustitución de aminoácido que confiere resistencia a uno o más inhibidores de BRAF en el polipéptido de BRAF mutante; poner en contacto dicho fármaco potencial con el polipéptido de BRAF mutante; y detectar la interacción de dicho fármaco potencial con el polipéptido de BRAF mutante; en el que un compuesto que es capaz de interactuar con el polipéptido de BRAF mutante se identifica como un inhibidor de BRAF de segunda generación. En enseñanzas adicionales, el compuesto de ensayo es un miembro de una biblioteca de compuestos.

Se desvela en el presente documento un compuesto aislado que es un inhibidor de BRAF de segunda generación o un compuesto que es útil en el tratamiento de un cáncer, en el que el compuesto se identifica como un inhibidor de BRAF de segunda generación o un compuesto que es útil en el tratamiento de cáncer de acuerdo con un método descrito en el presente documento.

Se desvela en el presente documento un método para inhibir la actividad de un polipéptido de BRAF mutante, que comprende poner en contacto un polipéptido de BRAF mutante con un compuesto que es un inhibidor de BRAF de segunda generación. También se enseña que el compuesto inhibe además la actividad de un polipéptido de BRAF de tipo silvestre y/o un polipéptido de BRAF V600E. Se desvela en el presente documento que la puesta en contacto del polipéptido de BRAF mutante con el inhibidor de BRAF de segunda generación sucede *in vitro*. También se desvela que la puesta en contacto sucede *in vivo*. En algunas enseñanzas, el contacto sucede en un sujeto, por ejemplo, en un sujeto que tiene cáncer. En algunas divulgaciones, el sujeto ha recaído desde el tratamiento con RAF-265. En enseñanzas ejemplares, el cáncer es un melanoma.

Se enseña en el presente documento un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que es un inhibidor de BRAF de segunda generación. En enseñanzas ejemplares, el cáncer contiene una o más mutaciones en BRAF, en el que la o las mutaciones confieren resistencia a RAF-265 en un polipéptido de BRAF. En divulgaciones adicionales el compuesto inhibe además la actividad de un polipéptido de BRAF de tipo silvestre y/o un polipéptido de BRAF V600E. En algunas divulgaciones el sujeto ha recaído desde el tratamiento con RAF-265. En divulgaciones ejemplares, el cáncer es un melanoma.

Se desvela en el presente documento un método para explorar a un sujeto que tiene cáncer con respecto a una mutación de BRAF que confiere resistencia al tratamiento con un inhibidor de RAF, que comprende obtener una muestra que contiene células cancerosas del sujeto, e identificar en la muestra una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF que contiene una o más mutaciones con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o un polipéptido de BRAF V600E (SEQ ID NO: 3), apareciendo las mutaciones en posiciones que codifican uno o más aminoácidos en el polipéptido de BRAF seleccionado del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748, en el que la presencia de la molécula de ácido nucleico en la muestra que contiene células cancerosas identifica al sujeto como resistente al tratamiento con un inhibidor de RAF. En divulgaciones ejemplares, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido de BRAF que tiene uno o más sustituciones de aminoácidos con respecto a un polipéptido de BRAF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) o un polipéptido de BRAF V600E (SEQ ID NO: 4) seleccionado del grupo que consiste en A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F. En algunas divulgaciones, la presencia de la molécula de ácido nucleico en la muestra que contiene células cancerosas identifica que el sujeto tiene un riesgo relativamente alto de recaída durante el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación. Se enseña que la presencia de la molécula de ácido nucleico en la muestra que contiene células cancerosas identifica al sujeto como insensible al tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación. Se enseña que el inhibidor de BRAF de primera generación es RAF-265. También se enseña que la presencia de la molécula de ácido nucleico en la muestra que contiene células cancerosas estratifica el sujeto para el tratamiento con un inhibidor de BRAF de segunda generación. En enseñanzas ejemplares, la presencia de la molécula de ácido nucleico en la muestra que contiene células cancerosas se determina por un método que comprende determinar la secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de BRAF. En otras enseñanzas, la presencia de la molécula de ácido nucleico en la muestra que contiene células cancerosas se

determina detectando un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico usando un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido de BRAF que contiene una mutación en una posición seleccionada del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. También se enseñan en el presente documento métodos que comprenden además administrar un inhibidor de BRAF de segunda generación a un sujeto en el que se detectó la presencia de una o más mutaciones de BRAF.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la secuencia de nucleótidos de BRAF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) (n.º de Secuencia de Referencia de NCBI: NM_004333.4; gi 187608632).

La Figura 2 representa la secuencia de nucleótidos de BRAF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) (n.º de Secuencia de Referencia de NCBI: NP_004324.2; gi 33188459).

La Figura 3 representa la secuencia de nucleótidos de BRAF V600E humano (SEQ ID NO: 3). La transversión de timidina a adenosina que explica la sustitución de aminoácidos V600E con respecto a la secuencia de BRAF de tipo silvestre está subrayada.

La Figura 4 representa la secuencia polipeptídica de BRAF V600E humano (SEQ ID NO: 4). La sustitución de V600E con respecto a la secuencia de BRAF de tipo silvestre está subrayada.

La Figura 5 representa el paisaje mutacional de BRAF después de la selección de RAF265. Se muestran sustituciones de aminoácidos que suceden como resultado de mutaciones de alta frecuencia.

La Figura 6 representa el paisaje mutacional de BRAF después de selección de PLX4720. Se muestran sustituciones de aminoácidos que suceden como resultado de mutaciones de alta frecuencia.

La Figura 7 representa la localización estructural de tres sustituciones de aminoácidos comunes para las exploraciones tanto de RAF265 como de PLX4720.

La Figura 8 representa los resultados de estudios de inmunotransferencia de BRAF, los niveles de p-MEK1/2 y p-ERK1/2 después del tratamiento con concentraciones crecientes de PLX4720 en células que contienen BRAF de tipo silvestre, BRAF-V600E, BRAF-V600E-T521K, BRAF-V600E-V528F o BRAF-V600E-P686Q.

Descripción detallada de la invención

1. Actividad biológica de BRAF

La familia de proteínas de RAF contiene tres miembros: BRAF, ARAF y CRAF (también conocido como RAF-1). Cada una de las proteínas de RAF contiene un dominio regulador amino terminal, un bucle de activación y un dominio quinasa C terminal. La regulación de RAF implica la fosforilación de los dominios reguladores y catalíticos. Una vez activadas, las moléculas RAF actúan como serina/treonina quinasas capaces de activar moléculas de señalización corriente abajo por fosforilación.

RAF está implicada en la promoción de la proliferación celular por asociación con la ruta de señalización de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). En particular, las proteínas de RAF son los principales efectores de señalización mediada por Ras. Ras activada interacciona directamente con RAF y recluta RAF a la membrana celular del citoplasma. Tras la traslocación a la membrana celular, RAF unida a Ras experimenta una serie de acontecimientos de fosforilación y cambios conformacionales que actúan para activar la actividad serina/treonina quinasa de RAF. RAF también puede activarse mediante rutas independientes de Ras que implican interferón beta, proteína quinasa C (PKC) alfa, proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl-2, diversas proteínas de almacén, luz ultravioleta, radiación ionizante, retinoides, eritropoyetina y dimerización entre isoformas de RAF.

Una vez activada, RAF media en la señalización corriente abajo por fosforilación de las quinasas MEK1 y MEK2, que contienen una secuencia rica en prolina que permite el reconocimiento por RAF. BRAF es un activador mucho más potente de MEK1 y MEK2 que ARAF o RAF-1. MEK1 y MEK2, a su vez, fosforilan y activan ERK1 y ERK2, que después se traslocan al núcleo. ERK1 y ERK2 nucleares activan factores de transcripción tales como Elk-1, Fos, Jun, AP-1 y Myc, induciendo en última instancia transcripción de genes implicados en la proliferación celular, desdiferenciación y supervivencia, incluyendo, por ejemplo, ciclina D1, ciclina E y fosfatasa activadora de cdc 25.

La regulación positiva de señalización de RAF, que resulta de la presencia de mutaciones de activación en RAF o señalización aberrante mediante Ras, promueve la oncogénesis activando la cascada de señalización anterior dando como resultado proliferación y supervivencia celular aumentadas. Se han asociado mutaciones de activación en polipéptidos de RAF, especialmente en BRAF, con una alta frecuencia de cánceres humanos. Una de dichas mutaciones de BRAF es una transversión individual de timidina a adenosina, que convierte valina en el aminoácido

600 a glutamato. Aproximadamente dos tercios de los casos de melanoma albergan esta mutación de BRAF V600E oncogénica, que contribuye a la transformación de melanocitos mediante activación de señalización de MAPK. Muchos otros tipos de cáncer, incluyendo pero sin limitación cáncer de colon, de ovario y de tiroides, albergan de forma similar la mutación de BRAF V600E. En consecuencia, la dirección de RAF y, en particular, la dirección de BRAF V600E, es un enfoque prometedor para la terapia de cáncer. BRAF es una diana atractiva para la terapia debido al alto grado de especificidad presentado para sus sustratos de MEK1 y MEK2. Varios inhibidores de BRAF están actualmente en desarrollo clínico. Uno de dichos inhibidores es el compuesto RAF-265, que es eficaz contra las tres isoformas de RAF así como contra BRAF V600E. RAF-265 ha sido prometedor en la clínica, lo que indica que la dirección de RAF es un método viable de terapia de cáncer.

Como se usa de forma intercambiable en el presente documento, las expresiones “actividad de RAF”, “actividad biológica de RAF” y “actividad funcional de RAF” incluyen actividades ejercidas por una proteína RAF, por ejemplo, BRAF, en una célula o tejido sensible a RAF, por ejemplo, una célula cancerosa o un cáncer, o una molécula diana de RAF, como se determina *in vivo* o *in vitro*, de acuerdo con técnicas convencionales. La actividad de RAF puede ser una actividad directa, tal como una asociación con una molécula diana de RAF, por ejemplo, MEK1 o MEK2, o fosforilación de un sustrato de RAF, por ejemplo, MEK1 o MEK2. Como alternativa, una actividad de RAF puede ser una actividad indirecta, tal como un acontecimiento biológico corriente abajo mediado por la interacción de la proteína RAF con una molécula diana de RAF, por ejemplo, MEK1 o MEK2. Como RAF está en una ruta de transducción de señal que implica MEK1 y MEK2, dichos acontecimientos biológicos corriente abajo incluyen pero sin limitación, por ejemplo, fosforilación de MBP, fosforilación de ERK1 o ERK2, cambios en la regulación de los genes diana de ERK1 o ERK2, y alteraciones en la proliferación o viabilidad celular.

II. Mutaciones de resistencia de BRAF

Aunque el tratamiento de cáncer con inhibidores de RAF, por ejemplo, inhibidores de BRAF, es un enfoque terapéutico prometedor, los pacientes que reciben dicha terapia pueden recaer o no responder, y como resultado la enfermedad de los pacientes progresa. Como se describe en el presente documento, la presente invención se refiere al descubrimiento de mutaciones en BRAF que confieren resistencia a inhibidores de RAF actualmente en desarrollo clínico. La adquisición de dichas mutaciones en células cancerosas hace a los pacientes resistentes al tratamiento con ciertos inhibidores de RAF. En realizaciones ejemplares, la invención se refiere al desarrollo de resistencia al inhibidor de RAF RAF-265.

(A) Identificación de mutaciones de BRAF que confieren resistencia a inhibidores de RAF

En diversas realizaciones, la presente invención se refiere a métodos para identificar mutaciones en un polipéptido de BRAF, o mutaciones en una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de BRAF, que confiere resistencia del polipéptido de BRAF a fármacos que inhiben la actividad de RAF. Un “polipéptido de BRAF mutante”, como se hace referencia en el presente documento, incluye un polipéptido de BRAF que contiene una o más mutaciones que confieren resistencia a uno o más inhibidores de BRAF conocidos. Además de la o las mutaciones que confieren resistencia a un inhibidor de BRAF, un polipéptido de BRAF mutante puede contener una sustitución V600E. No se considera que un polipéptido de BRAF que contenga solamente la sustitución V600E sin ninguna otra mutación con respecto a la secuencia polipeptídica de BRAF de tipo silvestre sea un “polipéptido de BRAF mutante” como se define en el presente documento. Una “molécula de ácido nucleico de BRAF mutante”, como se hace referencia en el presente documento, incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF mutante. Las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de BRAF que contienen una o más mutaciones pueden crearse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida de una secuencia de ácido nucleico de BRAF de tipo silvestre o una secuencia de ácido nucleico de BRAF V600E, que pueden realizarse en *E. coli*. En realizaciones ejemplares, la secuencia de ácido nucleico de BRAF de tipo silvestre es una secuencia de ácido nucleico de BRAF de tipo silvestre humana (SEQ ID NO: 1), y la secuencia de ácido nucleico de BRAF V600E es una secuencia de ácido nucleico de BRAF V600E humana (SEQ ID NO: 3). Las moléculas de ácido nucleico de BRAF mutante pueden después explorarse en células de otro modo sensibles al tratamiento con un inhibidor de BRAF para identificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF mutante que es resistente al tratamiento con el inhibidor de RAF.

Pueden usarse varios métodos adecuados para explorar ácidos nucleicos de BRAF mutante y polipéptidos de BRAF mutante con respecto a resistencia al tratamiento con un inhibidor de RAF, por ejemplo, RAF-265. En todos los casos, un polipéptido de BRAF mutante que es resistente al tratamiento con un inhibidor de RAF muestra mayor actividad de BRAF en presencia del inhibidor de RAF que un polipéptido de BRAF de tipo silvestre o un polipéptido de BRAF V600E en presencia del inhibidor de RAF. En un método ejemplar, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF mutante puede expresarse en células de otro modo sensibles a tratamiento con un inhibidor de RAF. Una línea celular ejemplar útil para este fin es la línea celular de melanoma A375. Después de la expresión del polipéptido de BRAF mutante, las células pueden tratarse con un inhibidor de RAF. Una actividad del polipéptido de BRAF mutante puede después medirse y compararse con la actividad de un polipéptido de BRAF de tipo silvestre (o un polipéptido de BRAF V600E) expresado y tratado de forma similar con el inhibidor de RAF.

La actividad de un polipéptido de BRAF puede determinarse, por ejemplo, midiendo la proliferación o viabilidad celular después del tratamiento con el inhibidor de BRAF, en el que la proliferación o viabilidad se correlacionan positivamente con la actividad de BRAF. El crecimiento, la proliferación o la viabilidad celulares pueden determinarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En una realización, el crecimiento celular puede determinarse usando ensayos de proliferación/viabilidad celular basados en pocillos tales como MTS o Cell Titer GLo, en los que el crecimiento celular en presencia de un inhibidor de RAF se expresa como un porcentaje del observado en células no tratadas cultivadas en ausencia del inhibidor de RAF. En ciertas realizaciones, la resistencia se define como un desplazamiento en el valor de GI50 de al menos 2 veces, más preferentemente al menos 3 veces, más preferentemente al menos 4-5 veces, con respecto a un control adecuado. En otras realizaciones, la resistencia se define como un valor de GI50 de $\sim 1 \mu\text{M}$). La actividad de un polipéptido de BRAF también puede medirse, por ejemplo, determinando la cantidad relativa de MEK1/2 o ERK1/2 fosforilada presente en la célula después del tratamiento con el inhibidor de BRAF. La actividad de un polipéptido de BRAF de tipo silvestre o mutante también puede determinarse usando un ensayo de fosforilación *in vitro*, en el que la actividad de BRAF se determina midiendo la proporción de MEK1/2 o ERK1/2 fosforilada en el ensayo después del tratamiento con el inhibidor de BRAF. Como se ha observado anteriormente, MEK1/2 es un sustrato de BRAF, mientras que ERK1/2 es un sustrato de MEK1/2, y actúa como un indicador corriente abajo de la actividad de BRAF. Se identifica que un polipéptido de BRAF mutante que tiene mayor actividad que un polipéptido de BRAF de tipo silvestre o un polipéptido de BRAF V600E después del tratamiento con un inhibidor de RAF contiene una mutación que confiere resistencia a un inhibidor de RAF. La mutación que confiere resistencia a un inhibidor de RAF puede después identificarse secuenciando el ácido nucleico que codifica el polipéptido de BRAF mutante, o secuenciando el polipéptido de BRAF mutante directamente.

(B) Mutaciones de BRAF que confieren resistencia a RAF-265

De la manera anterior, se identificaron varios restos de aminoácidos del polipéptido de BRAF humano que, cuando se mutan, confieren resistencia al inhibidor de RAF RAF-265. Estos restos de aminoácidos incluyen uno o más de los siguientes: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos de BRAF mutante contienen una mutación con respecto a la secuencia polipeptídica de BRAF V600E en uno o más de estos restos de aminoácidos. En realizaciones relacionadas, las moléculas de ácido nucleico de BRAF mutantes contienen una mutación con respecto a la secuencia polipeptídica de BRAF V600E en uno o más nucleótidos que codifican uno o más de estos restos de aminoácidos. En realizaciones ejemplares, los polipéptidos de BRAF mutantes presentados en el presente documento contienen una o más de las siguientes mutaciones de resistencia: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F. En otras realizaciones ejemplares, las moléculas de ácido nucleico de BRAF mutante presentadas en el presente documento codifican un polipéptido de BRAF mutante que contiene una o más de las siguientes mutaciones de resistencia: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

Las moléculas de ácido nucleico de BRAF mutante y polipéptidos de BRAF mutante de la invención pueden contener otras mutaciones además de las descritas en el presente documento. Por ejemplo, un polipéptido de BRAF mutante de la invención puede contener mutaciones en otros restos de aminoácidos además de una o más mutaciones en los restos de aminoácidos A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En todos los casos, los polipéptidos de BRAF mutante de la invención tienen actividad de BRAF, y las moléculas de ácido nucleico de BRAF mutante de la invención codifican polipéptidos que tienen actividad de BRAF. En una realización ejemplar, una molécula de BRAF mutante de la invención tiene una mutación en el resto de aminoácido V600, además de una o más mutaciones en los restos de aminoácidos A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En una realización, la mutación en V600 es una mutación de activación, por ejemplo, una mutación V600E. Se ha mostrado que el inhibidor de RAF RAF-265 inhibe eficazmente la actividad de BRAF que contiene una mutación de activación V600E. Esta mutación está presente en un alto porcentaje de tumores, incluyendo aproximadamente dos tercios de melanomas. Las mutaciones de resistencia de BRAF descritas en el presente documento confieren resistencia a inhibidores de RAF tales como RAF-265 sobre el alelo de BRAF-V600E. En consecuencia, los pacientes que tienen un tumor que contiene BRAF-V600E están en riesgo de recaída durante el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación tal como RAF-265 debido a la adquisición de una segunda mutación de BRAF en cualquiera de los siguientes sitios: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748.

Como se describe en el presente documento, la identificación de mutaciones en BRAF que confieren resistencia a inhibidores de BRAF permite el diseño y la exploración de "inhibidores de RAF de segunda generación" que son eficaces en la inhibición de una proteína de BRAF que tiene una o más mutaciones de resistencia. Dichos inhibidores de RAF de segunda generación son útiles en muchas aplicaciones clínicas y terapéuticas, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer. La identificación de mutaciones de resistencia en el polipéptido de BRAF también permite la exploración de pacientes que tienen un cáncer para determinar la presencia o ausencia de una o más

mutaciones de resistencia de BRAF en el cáncer. La determinación de la presencia o ausencia de una o más mutaciones de resistencia de BRAF en un cáncer permite la alteración de la estrategia de tratamiento de un paciente de cáncer. Por ejemplo, la identificación de una o más de las mutaciones de resistencia de BRAF descritas en el presente documento en una muestra que contiene células cancerosas de un paciente que tiene un cáncer puede usarse para estratificar al paciente con respecto al tratamiento con un inhibidor de RAF de segunda generación. De forma similar, la identificación de una o más de las mutaciones de resistencia de BRAF descrita en el presente documento en una muestra que contiene células cancerosas de un paciente que tienen un cáncer puede usarse para estratificar al paciente con respecto al tratamiento con un inhibidor de MEK. La identificación de mutaciones de resistencia de BRAF también permite la exploración e identificación de pacientes que tienen un alto riesgo de recaída o falta de respuesta a tratamiento con ciertos inhibidores de RAF.

III. Métodos para identificar inhibidores de BRAF de segunda generación

La identificación de mutaciones de resistencia de BRAF permite el desarrollo y/o la identificación de "inhibidores de RAF de segunda generación". Como se usa en el presente documento, un inhibidor de RAF de segunda generación es un agente que inhibe eficazmente la actividad de un polipéptido de RAF, por ejemplo, un polipéptido de BRAF, que contiene una o más mutaciones descritas en el presente documento. Un inhibidor de RAF de segunda generación puede inhibir o no la actividad de un polipéptido de RAF de tipo silvestre además de un polipéptido de RAF mutante. En una realización preferida, un inhibidor de RAF de segunda generación inhibe la actividad de un polipéptido de BRAF V600E (SEQ ID NO: 4), así como un polipéptido de BRAF V600E que tiene adicionalmente una o más de las mutaciones de resistencia descritas en el presente documento. En una realización ejemplar, un inhibidor de RAF de segunda generación inhibe la actividad de un polipéptido de BRAF que contiene mutaciones en uno o más de los siguientes restos de aminoácidos: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748.

En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para identificar un compuesto de ensayo como un inhibidor de RAF de segunda generación de acuerdo con la reivindicación 8. En una realización, un compuesto puede identificarse como un inhibidor de RAF de segunda generación determinando la actividad de RAF relativa de un polipéptido de BRAF mutante en presencia o ausencia del compuesto, con respecto a un polipéptido de BRAF no mutante (por ejemplo, un polipéptido de BRAF de tipo silvestre, o un polipéptido de BRAF V600E). Cuando esté en presencia de un compuesto que sea un inhibidor de RAF de segunda generación, un polipéptido de BRAF mutante tiene un menor nivel de actividad de RAF que en ausencia del compuesto. Cuando esté en presencia de un compuesto que no sea un inhibidor de RAF de segunda generación, un polipéptido de BRAF mutante tiene un nivel equivalente o mayor de actividad de RAF que en ausencia del compuesto. En ciertas realizaciones, la actividad de RAF puede medirse en un ensayo *in vitro* usando polipéptidos de BRAF recombinantes. En otras realizaciones, la actividad de RAF puede medirse en un ensayo *in vivo* usando células cultivadas o animales experimentales que expresan polipéptidos de BRAF.

Cualquier indicador de actividad de BRAF es adecuado para determinar si un compuesto es o no un inhibidor de RAF de segunda generación. En una realización ejemplar, la actividad de BRAF se determina midiendo la fosforilación del sustrato de RAF MEK1/2, en el que una reducción en la fosforilación de MEK1/2 indica una reducción de la actividad de RAF. En una realización, la fosforilación de MEK1/2 se mide en una célula o un extracto celular. En una realización alternativa, la fosforilación de MEK1/2 se mide en un ensayo de fosforilación *in vitro* usando proteínas purificadas o recombinantes. Los métodos para detectar fosforilación de MEK1/2 conocidos en la técnica son adecuados para medir la fosforilación de MEK1/2 como un indicio de la actividad de un polipéptido de BRAF o un polipéptido de BRAF mutante. Dichos métodos incluyen, pero sin imitación, transferencia de Western y espectroscopia de masas. En ciertas relaciones, puede realizarse un ensayo de fosforilación de MEK1/2 *in vitro* usando proteínas recombinantes. En otras realizaciones, puede realizarse un ensayo de fosforilación de MEK1/2 *in vivo* usando células cultivadas o animales experimentales.

En otra realización ejemplar, la actividad de BRAF se determina midiendo la fosforilación del sustrato de MEK ERK1/2, en el que una reducción en la fosforilación de ERK1/2 indica una reducción en la actividad de BRAF. En una realización, la fosforilación de ERK1/2 se mide en una célula o un extracto celular. En una realización alternativa, la fosforilación de ERK1/2 se mide en un ensayo de fosforilación *in vitro* usando proteínas purificadas o recombinantes. Métodos de detección de fosforilación de ERK1/2 conocidos en la técnica son adecuados para medir la fosforilación de ERK1/2 como un indicio de la actividad de un polipéptido de BRAF o un polipéptido de BRAF mutante. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, espectroscopia de masas y transferencia de Western. En ciertas realizaciones, un ensayo de fosforilación de ERK1/2 puede realizarse *in vitro* usando proteínas recombinantes. En otras realizaciones, un ensayo de fosforilación de ERK1/2 puede realizarse *in vivo* usando células cultivadas o animales experimentales.

En una realización, una célula hospedadora que expresa un polipéptido de BRAF mutante se usa en la identificación de un inhibidor de RAF de segunda generación, en el que la sensibilidad de la célula hospedadora a un compuesto de ensayo identifica el compuesto de ensayo como un inhibidor de RAF de segunda generación. Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "sensibilidad de la célula hospedadora a un compuesto de ensayo" signifique que el compuesto de ensayo tiene un efecto medible en uno o más parámetros incluyendo el

crecimiento celular, la proliferación celular, la viabilidad celular y/o la transducción de señal intracelular (por ejemplo, transducción de señal mediada por BRAF como se demuestra, por ejemplo, por fosforilación de uno o más sustratos de BRAF, tales como MEK1/2, o una o más moléculas de señalización corriente abajo, tales como ERK1/2).

Un compuesto puede identificarse como un inhibidor de RAF de segunda generación determinando la viabilidad o tasa de proliferación de células que expresan un polipéptido de BRAF mutante en presencia o ausencia del compuesto. La línea celular usada en dicho ensayo debería ser sensible a un inhibidor de RAF cuando la línea celular exprese un polipéptido de BRAF de tipo silvestre, y debería ser resistente al inhibidor de RAF (es decir, un inhibidor de RAF de primera generación) cuando la línea celular exprese un polipéptido de BRAF mutante. Una línea celular ejemplar útil para la identificación de un inhibidor de RAF de segunda generación es la línea celular de melanoma A375. Las células A375 son sensibles al inhibidor de RAF RAF-265 cuando expresan un polipéptido de BRAF de tipo silvestre, pero son resistentes a RAF-265 cuando expresan un polipéptido de BRAF mutante, por ejemplo, un polipéptido de BRAF que contiene una o más de las siguientes mutaciones de resistencia: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

Cuando esté en presencia de un compuesto que es un inhibidor de RAF de segunda generación, una línea celular que expresa un polipéptido de BRAF mutante tiene una menor viabilidad o tasa de proliferación que en ausencia del compuesto. Cuando esté en presencia de un compuesto que no sea un inhibidor de RAF de segunda generación, una línea celular que expresa un polipéptido de BRAF mutante tiene una viabilidad o tasa de proliferación equivalente o mayor que en ausencia del compuesto. Métodos para medir la viabilidad celular y/o tasa de proliferación conocidos en la técnica son adecuados para determinar la sensibilidad de una línea celular que expresa un polipéptido de BRAF o un polipéptido de BRAF mutante a un compuesto de ensayo. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, medición de la exclusión de azul de Tripano, metabolismo de compuestos de tetrazolio, incorporación de timidina tritiada, incorporación de BrdU, captación de glucosa, concentración de ATP y nivel de apoptosis. En una realización, la proliferación celular puede determinarse usando ensayos de viabilidad/proliferación celular basados en pocillos tales como MTS o Cell Titer Glo. En ciertas realizaciones, la sensibilidad se define como un desplazamiento en el valor de GI50 de al menos 2 veces, más preferentemente al menos 3 veces, más preferentemente al menos 4-5 veces, con respecto a un control adecuado.

En consecuencia, en una realización, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer que comprende proporcionar una composición de ensayo que comprende un sustrato de BRAF y un polipéptido de BRAF de la presente invención, poner en contacto la composición de ensayo con un compuesto de ensayo en condiciones que permitan la fosforilación del sustrato de BRAF en ausencia del compuesto de ensayo, y determinar el efecto del compuesto en la fosforilación del sustrato de BRAF, en el que la modulación negativa de la fosforilación del sustrato de BRAF en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un inhibidor de RAF de segunda generación. Un compuesto identificado de este modo es un compuesto útil para tratar un cáncer, por ejemplo, un cáncer en el que se ha detectado un polipéptido de RAF mutante. Un polipéptido de BRAF útil en los métodos anteriores es un polipéptido de BRAF que contiene una o más mutaciones que confieren resistencia al inhibidor de RAF RAF-265, por ejemplo, un polipéptido de BRAF que contiene una o más de las mutaciones descritas en el presente documento. Un sustrato de BRAF útil en los métodos anteriores es, por ejemplo, MEK1/2. Una disminución, reducción o modulación negativa de fosforilación de MEK1/2 es un indicio de que el compuesto es un inhibidor de RAF. De forma similar, una molécula de señalización de RAF corriente abajo útil en los métodos anteriores es, por ejemplo, ERK1/2. Una disminución, reducción o modulación negativa de fosforilación de ERK1/2 es un indicio de que el compuesto es un inhibidor de RAF. Los métodos anteriores pueden realizarse *in vitro* en los que los polipéptidos de BRAF y los sustratos de BRAF son proteínas aisladas o purificadas. Los métodos anteriores también pueden realizarse *in vitro* en los que los polipéptidos de BRAF y los sustratos de BRAF son componentes de un extracto celular. En esta realización, una composición de ensayo es un extracto celular. Un control adecuado es cualquier control que resultaría evidente para un experto en la materia que realiza el método, e incluye, por ejemplo, una composición de ensayo similar o idéntica no tratada con un compuesto de ensayo o tratada con un compuesto de control, o una composición de ensayo análoga o extracto celular que comprende un polipéptido de BRAF "de tipo silvestre" o un polipéptido de BRAF V600E.

En otra realización, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que es un inhibidor de RAF de segunda generación, que comprende proporcionar una célula que comprende un polipéptido de BRAF mutante, poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo, y determinar el efecto del compuesto en la fosforilación de MEK1/2, fosforilación de ERK1/2 o proliferación celular, en el que una disminución, reducción o modulación negativa de fosforilación de MEK1/2, fosforilación de ERK1/2 o proliferación celular en comparación con un control apropiado identifica el compuesto como un inhibidor de RAF de segunda generación. Un compuesto identificado de este modo es un compuesto útil para tratar un cáncer, por ejemplo, un cáncer en el que se ha detectado un polipéptido de BRAF mutante. Un control adecuado es cualquier control que resultaría evidente para un experto en la materia que realice el método, e incluye, por ejemplo, una célula similar o idéntica no tratada con un compuesto de ensayo o tratada con un compuesto de control, o una célula o un extracto celular análogo en el que se expresó BRAF recombinante "de tipo silvestre" o BRAF V600E.

En una realización, el compuesto de ensayo usado en los métodos anteriores es un inhibidor de RAF que inhibe una actividad biológica de un polipéptido de BRAF V600E. En una realización, los inhibidores de RAF que pueden usarse como compuestos de ensayo para determinar si son inhibidores de RAF de segunda generación incluyen PLX4032, PLX5568, XL281, y los derivados de imidazol-2-carboxamida descritos en el documento US2008/0108615.

En otra realización, el compuesto de ensayo es un miembro de una biblioteca de compuestos de ensayo. Una "biblioteca de compuestos de ensayo" se refiere a un panel que comprende múltiples compuestos de ensayo. Se ha descrito un enfoque para la síntesis de bibliotecas moleculares de moléculas orgánicas pequeñas (Carell *et al.* (1994). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061). Los compuestos de la presente invención pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de bibliotecas combinatorias conocidas de la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase en solución o fase sólida paralela abordables espacialmente, métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución, el método de la biblioteca de "una perla un compuesto", y métodos de bibliotecas sintéticas usando selección de cromatografía de afinidad. El enfoque de biblioteca biológica se limita a bibliotecas peptídicas, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos de péptidos, oligómeros no peptídicos, o moléculas pequeñas (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145). Otros métodos ejemplares para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo, en: Erb *et al.* (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Horwell *et al.* (1996) *Immunopharmacology* 33:68- ; y en Gallop *et al.*, (1994); *J. Med. Chem.* 37: 1233-. Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (Lam (1991) *Nature* 354: 82-84), microplacas (Fodor (1993) *Nature* 364: 555-556), bacterias (Ladner USP 5.223.409), esporas (Ladner USP '409), plásmidos (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249: 386-390); (Devlin (1990) *Science* 249: 404-406); (Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310). En otra realización más, los polipéptidos combinatorios se producen a partir de una biblioteca de ADNc. Los compuestos ejemplares que pueden explorarse con respecto a actividad incluyen, pero sin limitación, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas orgánicas pequeñas y bibliotecas de extractos de productos naturales.

Los inhibidores de RAF de segunda generación también pueden diseñarse racionalmente basándose en la estructura de alelos de BRAF que contienen una o más de las mutaciones de resistencia descritas en el presente documento. Como se describe en el presente documento, los restos de BRAF que confieren resistencia a inhibidores de RAF se localizan en la misma región de BRAF con la que se une el inhibidor de RAF de primera generación RAF-265. La identificación de alelos mutantes de BRAF que confieren resistencia a inhibidores de RAF permite la comparación entre la estructura de los alelos mutantes y el BRAF de tipo silvestre, o a BRAF V600E. El conocimiento de las características estructurales alteradas que confieren resistencia a inhibidores de RAF de primera generación permite el diseño racional y la construcción de ligandos, incluyendo inhibidores, que se unirán con e inhibirán los alelos mutantes. Dichos inhibidores pueden diseñarse de modo que se unan con ambos alelos de BRAF mutantes, no conteniendo BRAF V600E una mutación secundaria descrita en el presente documento, y BRAF de tipo silvestre. Los inhibidores diseñados para unirse con un alelo de BRAF que contiene una o más mutaciones descritas en el presente documento son inhibidores de RAF de segunda generación. La capacidad de dichos inhibidores diseñados racionalmente para inhibir una actividad biológica de un polipéptido de BRAF mutante puede confirmarse usando los ensayos *in vitro* y/o *in vivo* descritos en el presente documento.

La estructura de un polipéptido de BRAF que contiene una o más de las mutaciones de resistencia descritas en el presente documento puede determinarse por modelización asistida por ordenador, o determinando la estructura cristalina o en solución del polipéptido de BRAF mutante. Puede usarse cualquier método adecuado conocido en la técnica para determinar la estructura de un polipéptido de BRAF mutante.

Los métodos de modelización asistidos por ordenador ejemplares incluyen el uso de programas de software tales como PYMOL, CAVITY (descrito en *J. Comp. Aided. Mol. Des.* (1990) 4: 337-354) y Discovery Studio® (Accelrys, San Diego, CA). Se describen técnicas adicionales útiles para modelización molecular asistida por ordenador en *J. BUON.* (2007) 12 Supl 1: S101-18. También puede usarse análisis basado en ordenador de una proteína con una estructura conocida para identificar moléculas que se unirán con la proteína. Dichos métodos clasifican moléculas basándose en su forma complementaria a un sitio de receptor. Por ejemplo, usando una base de datos tridimensional, puede usarse un programa tal como DOCK para identificar moléculas que se unirán con XBP-1, IRE-1 alfa, y/o EDEM. Véase DesJarlias *et al.* (1988) *J. Med. Chem.* 31:722; Meng *et al.* (1992) *J. Computer Chem.* 13:505; Meng *et al.* (1993) *Proteins* 17: 266; Shoichet *et al.* (1993) *Science* 259: 1445. Además, la complementariedad electrónica de una molécula con una proteína diana también puede analizarse para identificar moléculas que se unan con la diana. Esto puede determinarse usando, por ejemplo, un campo de fuerza de mecánica molecular como se describe en Meng *et al.* (1992) *J. Computer Chem.* 13: 505 y Meng *et al.* (1993) *Proteins* 17: 266. Otros programas que pueden usarse incluyen CLIX que usa un campo de fuerza de GRID en el acoplamiento de ligandos potenciales (véase, por ejemplo, Lawrence *et al.* (1992) *Proteins* 12: 31; Goodford *et al.* (1985) *J. Med. Chem.* 28: 849; y Boobbyer *et al.* (1989) *J. Med. Chem.* 32: 1083).

Puede realizarse cristalización por cualquier método de cristalización, incluyendo, pero sin limitación, métodos discontinuos, de diálisis y de difusión por vapor (por ejemplo, gota en reposo y gota colgante). También pueden realizarse microsiembra, macrosiembra y/o siembra en estrías de cristales para facilitar la cristalización. Pueden

formarse cristales que comprenden alelos mutantes de BRAF por una diversidad de diferentes métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden realizarse cristalizaciones por métodos discontinuos, de diálisis y de difusión de vapor (gota en reposo y gota colgante). Puede encontrarse una descripción detallada de preparaciones de cristalización de proteínas básicas en McRee, D., *Practical Protein Crystallography*, 2ª Ed. (1999), Academic Press Inc. Se proporcionan descripciones adicionales con respecto a la realización de experimentos de cristalización en Stevens *et al.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.*: 10(5): 558-63, y Patentes de Estados Unidos N.º 6.296.673; 5.419.278; y 5.096.676. Dichos cristales pueden usarse para realizar análisis de difracción de Rayos X o neutrones para determinar la estructura tridimensional de alelos mutantes de BRAF. Puede identificarse una estructura en solución de un polipéptido de BRAF o polipéptido de BRAF mutante usando espectroscopia de resonancia magnética nuclear usando técnicas conocidas en este campo. Se describen métodos adecuados para determinación de la estructura polipeptídica por cristalografía de Rayos X o espectroscopia de RMN en Brunger *et al.*, (1998) "Crystallography & NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination", *Acta Crystallogr D54*, 905-921; Brunger *et al.* (1987) "Solution of a Protein Crystal Structure with a Model Obtained From NMR Interproton Distance Restraints", *Science* 235, 1049-1053; Drenth, "Principles of Protein X-ray Crystallography", (1994), Springer-Verlag. pp. 1-19; y Narula *et al.* (1995) "Solution structure of the C terminal SH2 domain of the human tyrosine kinase Syk complexed with a phosphotyrosine pentapeptide" *Structure* 3, 1061-1073. Tras la identificación de la estructura cristalina o en solución de un polipéptido de RAF mutante, pueden identificarse inhibidores del polipéptido de BRAF mutante usando los enfoques de modelización asistidos por ordenador descritos anteriormente.

Los inhibidores de RAF de segunda generación identificados por los métodos anteriores son útiles para tratar una enfermedad o afección asociadas con la expresión de un polipéptido de RAF de tipo silvestre y/o mutante. Por ejemplo, los inhibidores de RAF de segunda generación son útiles para tratar un cáncer en un sujeto, particularmente un cáncer en el que se ha identificado un polipéptido de BRAF mutante. Como se enseña en el presente documento, los inhibidores de RAF de segunda generación son útiles para tratar un cáncer que contiene un polipéptido de BRAF que tiene una mutación en uno o más de los siguientes restos de aminoácidos: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. También se enseña que los inhibidores de RAF de segunda generación son útiles para tratar un cáncer que contiene un polipéptido de BRAF que tiene una o más de las siguientes mutaciones: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

IV. Moléculas de ácido nucleico aisladas

La presente invención se refiere a polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico relacionadas con el gen de BRAF y su producto génico respectivo. Estos polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico son aislables y purificables desde células de mamífero. En aspectos particulares de la invención, las moléculas de ácido nucleico de BRAF aisladas descritas en el presente documento comprenden una o más mutaciones que confieren resistencia a un inhibidor de BRAF. Una "molécula de ácido nucleico de BRAF mutante", como se hace referencia en el presente documento, incluye una molécula de ácido nucleico de BRAF que codifica un polipéptido de BRAF mutante, es decir, un polipéptido de BRAF que contiene una o más mutaciones que confieren resistencia a uno o más inhibidores de BRAF conocidos.

Se contempla que una molécula de ácido nucleico de BRAF aislada y purificada, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de BRAF mutante, puede tomar la forma de ARN o ADN. Como se usa en el presente documento, la expresión "transcrito de ARN" se refiere a una molécula de ARN que es el producto de la transcripción de una molécula de ácido nucleico de ADN. Dicho transcrito puede codificar uno o más polipéptidos.

Como se usa en la presente solicitud, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ARN o ADN, que se ha aislado, tal como que está libre de ácido nucleico genómico total. Por lo tanto, un "polinucleótido que codifica BRAF" se refiere a un segmento de ácido nucleico que contiene secuencias codificantes de BRAF, pero está aislado de, o purificado y libre de, ADN genómico total y proteínas. Cuando la presente solicitud se refiere a la función o actividad de un polinucleótido o ácido nucleico que codifica BRAF, se entiende que el polinucleótido codifica una molécula que es capaz de realizar una actividad de un polipéptido de BRAF de tipo silvestre, por ejemplo, fosforilación de los sustratos MEK1 o MEK2.

Se entiende que el término "ADNc" se refiere a ADN preparado usando ARN como un molde. La ventaja de usar un ADNc, a diferencia de ADN genómico o un transcrito de ARN es la estabilidad y la capacidad de manipular la secuencia usando tecnología de ADN recombinante (Véase Sambrook, 1989; Ausubel, 1996). Puede haber ocasiones en las que se prefiera la secuencia genómica completa o parcial. Como alternativa, el ADNc puede ser ventajoso porque representa regiones codificantes de un polipéptido y elimina intrones y otras regiones reguladoras.

También se contempla que un ácido nucleico que codifica BRAF dado o gen de BRAF de una célula dada puede representarse por variantes naturales o cepas que tienen secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes pero, no obstante, codifican un polipéptido de BRAF activo. En una realización preferida, el polipéptido de BRAF activo es un polipéptido de BRAF humano activo. En realizaciones particularmente preferidas, el polipéptido de BRAF activo

es un polipéptido de BRAF mutante que tiene una actividad de un polipéptido de BRAF de tipo silvestre, pero que es resistente a uno o más inhibidores de BRAF conocidos. En consecuencia, ciertos aspectos de la presente invención abarcan derivados de BRAF con cambios de aminoácidos mínimos, pero que poseen la misma función biológica.

El término "gen" se usa para mayor simplicidad para hacer referencia a una proteína, un polipéptido o una unidad codificante de péptidos funcional. Como se entenderá por los expertos en la materia, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos génicos modificados técnicamente más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, proteínas de fusión y proteínas mutantes. La molécula de ácido nucleico que codifica BRAF puede comprender una secuencia de ácido nucleico contigua de las siguientes longitudes: al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900, 10000, 10100, 10200, 10300, 10400, 10500, 10600, 10700, 10800, 10900, 11000, 11100, 11200, 11300, 11400, 11500, 11600, 11700, 11800, 11900, 12000 o más nucleótidos, nucleósidos o pares de bases, dichas secuencias pueden ser idénticas o complementarias de, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma.

Diversas realizaciones de la invención se refieren a mutaciones genéticas en BRAF. Como se usa en el presente documento, una mutación se refiere a una adición, supresión o sustitución de un único nucleótido en un sitio en una molécula de ácido nucleico de BRAF. En una realización ejemplar, una molécula de ácido nucleico de BRAF mutante contiene una o más mutaciones que confieren resistencia a una terapia particular, tal como un inhibidor de BRAF, por ejemplo, RAF-265. En una realización relacionada, una molécula de ácido nucleico de BRAF mutante contiene uno o más mutaciones de modo que la molécula de ácido nucleico de BRAF mutante codifique un polipéptido de BRAF mutante, en el que el polipéptido de BRAF mutante contiene una o más mutaciones que confieren resistencia a una terapia particular, tal como un inhibidor de BRAF, por ejemplo, RAF-265. Por lo tanto, en aspectos particulares de la invención, una alteración en una secuencia da como resultado un cambio que afecta a las propiedades de un polipéptido codificado por la secuencia de modo que se produzca como resultado al menos algo de resistencia a la terapia, tal como terapia con un inhibidor de BRAF.

"Sustancialmente aislado de otras secuencias codificantes" significa que el gen de interés forma parte de la región codificante del segmento de ácido nucleico, y que el segmento no contiene partes grandes de ácido nucleico codificante de origen natural, tal como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de ADNc. Por supuesto, esto se refiere al segmento de ácido nucleico como se aisló originalmente, y no excluye genes o regiones codificantes añadidas posteriormente al segmento por manipulación humana.

En realizaciones particulares, la invención se refiere a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican polipéptidos o péptidos de BRAF mutantes de acuerdo con la presente invención que incluyen dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua de acuerdo con, o esencialmente correspondiente a polipéptidos de BRAF mutante. En realizaciones ejemplares, la invención se refiere a segmentos de ADN aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican una proteína, un polipéptido o un péptido de BRAF de acuerdo con la presente invención que incluye dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua de un polipéptido de BRAF que comprende una o más mutaciones que confieren resistencia a un inhibidor de BRAF. La o las mutaciones aparecen en las posiciones A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En otras realizaciones, la o las mutaciones también incluyen lo siguiente: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

Los segmentos de ácido nucleico usados en la presente invención, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN o ARN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud global pueda variar considerablemente. Se contempla por lo tanto que puede emplearse un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y el uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido.

Se contempla que las construcciones de ácido nucleico de la presente invención codifican un polipéptido de BRAF o un polipéptido de BRAF mutante. Una secuencia "heteróloga" se refiere a una secuencia que es ajena o exógena a

la secuencia restante. Un gen heterólogo se refiere a un gen que no se encuentra en la naturaleza adyacente a las secuencias con las que se coloca ahora.

En un ejemplo no limitante, puede prepararse una o más construcciones de ácido nucleico que incluyen un tramo contiguo de nucleótidos idénticos a o complementarios de todo o parte de un gen de BRAF. Una construcción de ácido nucleico puede comprender al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 20.000, 30.000, 50.000, 100.000, 250.000, aproximadamente 500.000, 750.000, hasta aproximadamente 1.000.000 de nucleótidos de longitud, así como construcciones de mayor tamaño, hasta e incluyendo tamaños cromosómicos (incluyendo todas las longitudes intermedias e intervalos intermedios), ya que la aparición de construcciones de ácidos nucleicos tales como un cromosoma artificial de levadura se conoce por los expertos habituales en la materia. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias" e "intervalos intermedios", como se usa en el presente documento, significa cualquier longitud o intervalo incluyendo o entre los valores indicados (es decir, todos los números enteros incluyendo y entre dichos valores). Los ejemplos no limitantes de longitudes intermedias incluyen aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, etc.; aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, etc.; aproximadamente 31, aproximadamente 32, etc.; aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, etc.; aproximadamente 101, aproximadamente 102, aproximadamente 103, etc.; aproximadamente 151, aproximadamente 152, aproximadamente 153, aproximadamente 97001, aproximadamente 1.001, aproximadamente 1002, aproximadamente 50.001, aproximadamente 50.002, aproximadamente 750.001, aproximadamente 750.002, aproximadamente 1.000.001, aproximadamente 1.000.002, etc. Los ejemplos no limitantes de intervalos intermedios incluyen de aproximadamente 3 a aproximadamente 32, de aproximadamente 150 a aproximadamente 500.001, de aproximadamente 3.032 a aproximadamente 7.145, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 15.000, de aproximadamente 20.07 a aproximadamente 1.000.003, etc.

Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a diversos ácidos nucleicos, incluyendo vectores, promotores, ácidos nucleicos terapéuticos y otros elementos de ácidos nucleicos implicados en la transformación y expresión en células. En ciertos aspectos, un ácido nucleico comprende un ácido nucleico de tipo silvestre o mutante. En aspectos particulares, un ácido nucleico codificada o comprende un ácido nucleico transcrito.

La expresión "ácido nucleico" se conoce bien en la técnica. Un "ácido nucleico" como se usa en el presente documento generalmente se referirá a una molécula (es decir, una cadena) de ADN, ARN o un derivado o análogo de la misma, que comprende una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina de origen natural hallada en el ADN (por ejemplo, una adenina "A", una guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C). La expresión "ácido nucleico" abarca los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como un subgénero de la expresión "ácido nucleico". El término "oligonucleótido" se refiere a una molécula de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 nucleobases de longitud. El término "oligonucleótido" se refiere a al menos una molécula de más de aproximadamente 100 nucleobases de longitud. Un "gen" se refiere a secuencia codificante de un producto génico, así como intrones y el promotor del producto génico. Además del gen de BRAF, otras regiones reguladoras tales como potenciadores para BRAF se contemplan como ácidos nucleicos para uso con composiciones y métodos de la invención reivindicada.

Estas definiciones se refieren en general a una molécula monocatenaria, pero en realizaciones específicas también abarcarán una cadena adicional que es parcialmente, sustancialmente o completamente complementaria de la molécula monocatenaria. Por lo tanto, un ácido nucleico puede abarcar una molécula bicatenaria o una molécula tricatenaria que comprende una o más cadenas complementarias o "complemento o complementos" de una secuencia particular que comprende una molécula. Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico monocatenario puede indicarse por el prefijo "mc", un ácido nucleico bicatenario por el prefijo "bc", y un ácido nucleico tricatenario por el prefijo "tc".

Un ácido nucleico puede prepararse por cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, por síntesis química, o por producción enzimática o producción biológica. Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico sintético (por ejemplo, un cebador de BRAF sintético que facilita la identificación de una mutación que confiere resistencia a un inhibidor de BRAF), incluyen un ácido nucleico compuesto por síntesis química *in vitro* usando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas de fase sólida tales como las descritas en el documento EP 266.032 o mediante intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato como se describe en Froehler *et al.*, 1986 y Patente de Estados Unidos n.º 5.705.629. En los métodos de la presente invención, pueden usarse uno o más oligonucleótidos. Se han desvelado diversos mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido de forma enzimática incluye uno producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR (véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 4.683.202 y 4.682.195, o una producida por síntesis de oligonucleótidos, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.645.897. Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido de forma biológica incluye un ácido nucleico recombinante producido (es decir, replicado) en una célula viva, tal como un vector de ADN recombinante replicado

en bacterias (véase por ejemplo, Sambrook *et al.* 1989).

Un ácido nucleico puede purificarse en geles de poliacrilamida, gradientes de centrifugación de cloruro de cesio o por cualquier otro medio conocido por un experto en la materia como parte de la evaluación de una mutación que confiere resistencia a BRAF (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989). En aspectos preferidos, un ácido nucleico es un ácido nucleico farmacológicamente aceptable. Los expertos en la materia conocen composiciones farmacológicamente aceptables, y se describen en el presente documento.

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN o ADN) que se ha aislado de, o está de otro modo libre de, el volumen de los ácidos nucleicos transcritos y genómicos totales de una o más células. En ciertas realizaciones, "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico que se ha aislado de, o está de otro modo libre de, el volumen de componentes celulares o componentes de reacción *in vitro*, incluyendo, por ejemplo, macromoléculas tales como lípidos o proteínas, moléculas biológicas pequeñas y similares.

V. Vectores de expresión y células hospedadoras

La presente invención abarca composiciones del vector de expresión y el uso de dichos vectores para codificar un polipéptido de BRAF, por ejemplo, un polipéptido de BRAF mutante, así como composiciones de células hospedadoras en las que se han introducido dichos vectores de expresión. El término "vector" se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico transportadora en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para la introducción en una célula en la que puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es ajena a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga de una secuencia en la célula pero está en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que la secuencia no se encuentra habitualmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales, que se describen en Sambrook *et al.*, 1989 y Ausubel *et al.*, 1996.

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

1. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan el inicio y la tasa de transcripción. Puede contener elementos genéticos en los que las proteínas y moléculas reguladoras pueden unirse tal como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las expresiones "situado operativamente", "unido operativamente", "bajo control" y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una localización y/u orientación funcionales correctas en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción y/o la expresión de esa secuencia. Un promotor puede usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural con un gen o una secuencia, como puede obtenerse aislando las secuencias 5' no codificantes localizadas cadena arriba del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor puede denominarse "endógeno". De forma similar, un potenciador puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, localizado bien cadena abajo o bien cadena arriba de esa secuencia. Como alternativa, se obtendrán ciertas ventajas situando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que no está normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador no asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otra célula procariota, viral, o eucariota, y promotores o potenciadores no "de origen natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción, y/o mutaciones que alteran la expresión.

De forma natural, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ácido nucleico en el tipo celular, orgánulo y organismo elegido para expresión. Los expertos en la

material de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos celulares para expresión de proteínas, por ejemplo, véase Sambrook *et al.* (1989). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles en las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido. El promotor puede ser heterólogo o exógeno, por ejemplo, un promotor no BRAF con respecto a la secuencia codificante de BRAF. En algunos ejemplos, se emplea un promotor procarionta para su uso con transcripción *in vitro* de una secuencia deseada. Los promotores procariontas para uso con muchos sistemas disponibles en el mercado incluyen T7, T3, y SP6

2. Señales de inicio y sitios de unión de ribosomas internos

También puede requerirse una señal de inicio específica para traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Un experto en la materia sería capaz fácilmente de determinar esto y proporcionar las señales necesarias. Se conoce bien que el codón de inicio debe estar "en fase" con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control de la traducción exógenas y codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de expresión puede estar potenciada por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados. En ciertas realizaciones de la invención, el uso de elementos de sitios de entrada de ribosomas internos (IRES) se emplea para crear mensajes multigénicos, o policistronicos.

3. Sitios de clonación múltiple

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con tecnología recombinante convencional para digerir el vector (véase, por ejemplo, Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, y Cocea, 1997). "Digestión con enzimas de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que actúa solamente en localizaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles en el mercado. El uso de dichas enzimas se entiende ampliamente por los expertos en la materia. Frecuentemente, un vector se linealiza o fragmenta usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que se liguén secuencias exógenas con el vector. "Ligamiento" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden estar o no contiguos entre sí. Los expertos en la materia de la tecnología recombinante conocen bien técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligamiento.

4. Sitios de corte y empalme

La mayoría de las moléculas de ARN eucariotas transcritas experimentarán corte y empalme de ARN para retirar intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucariotas genómicas pueden requerir sitios de corte y empalme donantes y/o aceptores para asegurar el procesamiento apropiado del transcrito para expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Chandler *et al.*, 1997).

5. Señales de terminación

Los vectores o construcciones de la presente invención generalmente comprenderán al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o un "terminador" está comprendido por las secuencias de ADN implicadas en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. Por lo tanto, en ciertas realizaciones se contempla una señal de terminación que termina la producción de un transcrito de ARN. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para conseguir niveles de mensaje deseables.

6. Señales de poliadenilación

Para expresión, particularmente expresión eucariota, se debe incluir típicamente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación apropiada del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de la invención, y/o puede emplearse cualquiera de dichas secuencias. Las realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, convenientes y/o que se sabe que actúan bien en diversas células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplasmático.

7. Orígenes de replicación

Para preparar un vector en una célula hospedadora, puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (con frecuencia denominados "ori"), que es una secuencia de ácido nucleico específica en la que se inicia la replicación. Como alternativa puede emplearse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula hospedadora es levadura.

8. Marcadores seleccionables y explorables

En ciertas realizaciones de la invención, las células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo la identificación fácil de células que contienen el vector de expresión. En general, un marcador seleccionable es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es uno en el que su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

Habitualmente la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Además de marcadores que confieren un fenotipo que permite la diferenciación de transformantes basándose en la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores incluyendo marcadores explorables, tales como GFP, que se basan en el análisis calorimétrico. Como alternativa, pueden utilizarse enzimas explorables tales como timidina quinasa (tk) de virus del herpes simple o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con análisis de FACS. No se cree que el marcador usado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Se conocen bien por los expertos en la materia ejemplos adicionales de marcadores seleccionables y explorables.

9. Células hospedadoras

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden usarse indistintamente. Puede emplearse en la invención una célula que comprende un polinucleótido de BRAF, bien mutado o bien de tipo silvestre. Todos estos términos incluyen también su descendencia, que se refiere a todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, "célula hospedadora" se refiere a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como un receptor para vectores. Una célula hospedadora puede "transfectarse" o "transformarse", lo que se refiere a un proceso por el que se transfiere o introduce en la célula hospedadora ácido nucleico exógeno. Una célula transformada incluye la célula objeto primaria y su descendencia. Una "célula hospedadora recombinante" se refiere a una célula hospedadora que porta un ácido nucleico recombinante, es decir un ácido nucleico que se ha manipulado *in vitro* o que es una copia replicada de un ácido nucleico que se ha manipulado de este modo.

Una célula hospedadora puede derivar de procariotas o eucariotas, dependiendo de si el resultado deseado es replicación del vector, expresión de parte de o todas las secuencias de ácido nucleico codificadas por vector, o producción de partículas virales infecciosas. Están disponibles para su uso como una célula hospedadora numerosas líneas celulares y cultivos, y pueden obtenerse a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que es una organización que actúa como un archivo para cultivos vivos y materiales genéticos. Un hospedador apropiado puede determinarse por un experto en la materia basándose en la cadena principal del vector y el resultado deseado. Puede introducirse un plásmido o cósmido, por ejemplo, en una célula hospedadora procariota para replicación de muchos vectores. Las células bacterianas usadas como células hospedadoras para la replicación del vector y/o expresión incluyen DH5a, JM109 y KC8, así como varios hospedadores bacterianos disponibles en el mercado tales como Células competentes SURE™ y Células Solopack™ Gold (Stratagene. RTM., La Jolla). Como alternativa, podrían usarse células bacterianas tales como *E. coli* LE392 como células hospedadoras para virus fagos.

Una célula hospedadora eucariota preferida de la invención es la línea celular de melanoma A375, en la que la célula se ha transformado con un vector de expresión que codifica un polipéptido de BRAF, por ejemplo, un polipéptido de BRAF mutante de la invención.

10. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte de o todas las composiciones analizadas anteriormente. Pueden emplearse sistemas basados en procariotas y/o eucariotas para su uso con la presente invención para producir secuencias de ácido nucleico de BRAF, o sus polipéptidos, proteínas y péptidos afines. Muchos de dichos sistemas están disponibles en el mercado y ampliamente.

El sistema de células de insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión de proteínas de un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.871.986, 4.879.236 y que puede obtenerse, por ejemplo, bajo el nombre MaxBac™ 2.0 de Invitrogen™ y sistema de expresión de baculovirus BacPack™ de Clontech™.

Otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen Sistema de Expresión de Mamífero Inducible Complete Control™ de Stratagene, que implica un receptor inducible por ecdisona sintético, o su sistema de expresión de pET, un sistema de expresión de *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible de Invitrogen, que porta el sistema T-Rex™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión de mamífero inducible que usa el promotor de CMV de longitud completa. Los sistemas de Tet-On™ y Tet-Off™ de Clontech™ pueden usarse para regular la expresión en un hospedador mamífero usando tetraciclina o sus derivados. La implementación de estos sistemas se describe en Gossen *et al.*, 1992 y Gossen *et al.*, 1995, y Patente de Estados Unidos n.º 5.650.298.

Invitrogen también proporciona un sistema de expresión de levadura denominado el Sistema de Expresión de *Pichia methanolica*, que se diseña para producción de alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un experto en la materia sabría cómo expresar un vector, tal como una construcción de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido afín.

VI. Moléculas polipeptídicas aisladas

Otro aspecto de la invención se refiere a proteínas de BRAF aisladas y/o purificadas, y partes biológicamente activas de las mismas. En aspectos particulares de la invención, los polipéptidos de BRAF descritos en el presente documento comprenden una o más mutaciones que confieren resistencia a un inhibidor de BRAF. Un "polipéptido de BRAF mutante", como se hace referencia en el presente documento, incluye un polipéptido de BRAF que contiene una o más mutaciones que confieren resistencia a uno o más inhibidores de BRAF conocidos.

Una proteína "aislada" o "purificada" o parte biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular cuando se produce por técnicas de ADN recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteínas de BRAF en las que la proteína se separa de componentes celulares de las células en las que se produce de forma natural o recombinante. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína de BRAF tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de proteína no BRAF (también denominada en el presente documento "proteína contaminante"), más preferentemente menos de aproximadamente 20 % de proteína no BRAF, aún más preferentemente menos de aproximadamente 10 % de proteína no BRAF, y más preferentemente menos de aproximadamente 5 % de proteína no BRAF. Cuando la proteína de BRAF o parte biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 10 %, y más preferentemente menos de aproximadamente el 5 % del volumen de la preparación de proteína. La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de proteína de BRAF en las que la proteína se separa de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de proteína de BRAF que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos no BRAF, más preferentemente menos de aproximadamente 20 % de precursores químicos o productos químicos no BRAF, aún más preferentemente menos de aproximadamente 10 % de precursores químicos o productos químicos no BRAF, y más preferentemente menos de aproximadamente 5 % de precursores químicos o productos químicos no BRAF.

Las partes biológicamente activas de una proteína de BRAF incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácidos de una proteína de BRAF, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, o la secuencia de aminoácidos de una proteína homóloga de una proteína de BRAF, que incluyen menos aminoácidos que una proteína de BRAF de longitud completa o la proteína de longitud completa que es homóloga a una proteína de BRAF, y muestran al menos una actividad de una proteína de BRAF. Típicamente, las partes biológicamente activas (péptidos, por ejemplo, péptidos que son, por ejemplo, de 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 o más aminoácidos de longitud) comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de una proteína de BRAF. Además, otras partes biológicamente activas, en las que otras regiones de la proteína se suprimen, pueden prepararse por técnicas recombinantes y evaluarse con respecto a una o más de las actividades descritas en el presente documento. Preferentemente, las partes biológicamente activas de una proteína BRAF incluyen uno o más dominios/motivos seleccionados o partes de los mismos que tienen actividad biológica. En realizaciones preferidas, las partes biológicamente activas de una proteína de BRAF comprenden una o más mutaciones con respecto a una secuencia de BRAF de tipo silvestre, en las que dichas una o más mutaciones, cuando están presentes en un polipéptido de BRAF mutante de longitud completa, confiere resistencia del polipéptido de BRAF mutante a inhibidores de BRAF conocidos. En realizaciones ejemplares, las mutaciones suceden en aminoácidos correspondientes a una o más de las siguientes posiciones en una proteína de BRAF de tipo silvestre: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En una realización relacionada, las mutaciones incluyen uno o más de los siguientes restos de BRAF: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

Se producen preferentemente proteínas de BRAF por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína se clona en un vector de expresión (como se ha descrito anteriormente), el vector de expresión se introduce en una célula hospedadora (como se ha descrito anteriormente) y la proteína de BRAF se expresa en la célula hospedadora. La proteína de BRAF puede después aislarse de las células por un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Como alternativa a la expresión recombinante, una proteína, un polipéptido o un péptido de BRAF puede sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales. Además, una proteína de BRAF nativa y/o una proteína de BRAF mutante pueden aislarse de células (por ejemplo, células cancerosas), por ejemplo usando un anticuerpo anti BRAF, que puede producirse por técnicas convencionales utilizando una proteína de BRAF o fragmento de la misma de la presente invención.

La invención también proporciona proteínas de fusión o quiméricas de BRAF. Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" de BRAF comprende un polipéptido de BRAF unido operativamente a un polipéptido no BRAF. Un "polipéptido de BRAF" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína de BRAF, mientras que un "polipéptido no BRAF" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homóloga de la proteína de BRAF, por ejemplo, una proteína que es sustancialmente diferente de la proteína de BRAF, que no presenta una actividad de BRAF y deriva del mismo organismo o uno diferente. Dentro de la proteína de fusión, se pretende que la expresión "unido operativamente" indique que el polipéptido de BRAF y el polipéptido no BRAF están fusionados en fase entre sí. El polipéptido no BRAF puede fusionarse con el extremo N o C terminal del polipéptido de BRAF. Por ejemplo, en una realización la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-BRAF en la que las secuencias de BRAF se fusionan con el extremo C terminal de las secuencias de GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de proteínas de BRAF recombinantes. En otra realización, la proteína de fusión es una proteína de BRAF que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N terminal. En ciertas células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras mamíferas), la expresión y/o secreción de una proteína de BRAF puede aumentarse mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.

Preferentemente, una proteína de fusión o quimérica de BRAF de la invención se produce por técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se ligan entre sí en fase de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo empleando extremos romos o escalonados para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de los extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable, y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden posteriormente hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992). Además, están disponibles en el mercado muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido de GST). Un ácido nucleico que codifica BRAF puede clonarse en dicho vector de expresión de modo que el resto de fusión se una en fase con la proteína de BRAF.

Se enseña en el presente documento un polipéptido de BRAF aislado de la invención que contiene una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones o supresiones) con respecto a una secuencia polipeptídica de BRAF de tipo silvestre. Se desvela en el presente documento un polipéptido de BRAF mutante que contienen una o más mutaciones con respecto a una secuencia polipeptídica de BRAF de tipo silvestre humana (SEQ ID NO: 2). En una realización particularmente preferida, la o las mutaciones confieren resistencia a un inhibidor de BRAF. En una realización ejemplar, el inhibidor de BRAF es RAF-265. Una proteína de BRAF mutante de la invención muestra una actividad biológica característica de una proteína de BRAF de tipo silvestre. Dicha actividad biológica puede incluir, por ejemplo, fosforilación de MEK1 o MEK2. Los polipéptidos de BRAF mutantes ejemplares de la invención incluyen polipéptidos de BRAF que comprenden una mutación en uno o más de los siguientes restos de aminoácidos con respecto al polipéptido de BRAF humano de tipo silvestre: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738, o C748. Los polipéptidos de BRAF mutantes ejemplares de la invención también incluyen polipéptidos de BRAF que comprenden una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos con respecto a la proteína de BRAF humana de tipo silvestre: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

Pueden generarse proteínas de BRAF mutantes por mutagénesis de una proteína de BRAF de tipo silvestre, o de la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de BRAF de tipo silvestre. También pueden identificarse proteínas de BRAF mutantes explorando bibliotecas combinatorias de mutantes de BRAF con respecto a una proteína de BRAF mutante que tenga una actividad deseada, por ejemplo, resistencia a un inhibidor de BRAF. Se conocen en este campo varias técnicas para explorar productos génicos de bibliotecas combinatorias realizadas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para explorar bibliotecas de ADNc con respecto a productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para exploración rápida de las bibliotecas génicas generadas por mutagénesis combinatoria. Las técnicas más ampliamente usadas, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para explorar bibliotecas génicas grandes típicamente incluyen clonar la biblioteca

génica en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó

VIII. Detección de mutaciones

Se desvelan en el presente documento métodos para detectar la presencia de una proteína de BRAF mutante en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica de un paciente de cáncer). Puede usarse una diversidad de métodos de exploración para detectar la presencia de una proteína de BRAF mutante de la invención en una muestra, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico y/o una muestra polipeptídica. En divulgaciones específicas, la muestra contiene una célula o un extracto celular. En divulgaciones ejemplares, la muestra se obtiene de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer.

Se enseñan en el presente documento métodos para detectar la presencia de mutaciones de resistencia en ADN genómico, ADNc y ARN (es decir, ARNm) que contienen una secuencia que codifica una proteína de BRAF, o parte biológicamente activa de la misma, de forma similar, se desvelan también en el presente documento métodos para detectar la presencia de mutaciones de resistencia en polipéptidos de BRAF, o partes biológicamente activas de los mismos. Pueden usarse métodos incluyendo, pero sin limitación, los siguientes para detectar la presencia de un polipéptido de BRAF, o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF, que tiene una mutación en uno o más de los siguientes restos de aminoácidos: A29, H72, S 113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738, o C748. Se desvela además que pueden usarse métodos que incluyen, pero sin limitación, lo siguiente para detectar la presencia de un polipéptido de BRAF, o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF, que tiene una o más de las siguientes mutaciones: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

Puede detectarse mutaciones puntuales usando métodos que incluyen electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante ("DGGE"), análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción ("RALPH"), métodos de escisión química o enzimática, secuenciación directa de regiones diana amplificadas por PCR (véase anteriormente), análisis de polimorfismo de conformación monocatenario ("SSCP"), reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación, hibridación, "captura híbrida" seguido de pirosecuenciación o secuenciación de moléculas individuales, y otros métodos conocidos en la técnica. Un método para explorar las mutaciones puntuales se basa en la escisión por RNasa de desapareamientos de pares de bases en heterodúplex ARN/ADN o ARN/ARN. Como se usa en el presente documento, el término "desapareamiento" se define como una región de uno o más nucleótidos desapareados o emparejados de forma errónea en una molécula de ARN/ARN, ARN/ADN o ADN/ADN bicatenaria. Esta definición incluye por lo tanto desapareamientos debidos a mutaciones de inserción/supresión, así como mutaciones puntuales de bases individuales o múltiples. La Patente de Estados Unidos n.º 4.946.773 describe un ensayo de escisión de desapareamiento de RNasa A que implica la hibridación de muestras de ensayo monocatenarias de ADN o ARN con una sonda de ARN, y posterior tratamiento de las dobles cadenas de ácido nucleico con RNasa A. Para la detección de desapareamientos, los productos monocatenarios del tratamiento con RNasa A, separados electroforéticamente según el tamaño, se comparan con dobles cadenas de control tratadas de forma similar. Las muestras que contienen fragmentos más pequeños (productos de escisión) no vistos en la doble cadena de control se puntúan como positivas.

Otros investigadores han descrito el uso de RNasa I en ensayos de desapareamiento. Por ejemplo, Promega comercializa un kit que contiene RNasa I que se ha indicado que escinde tres de cuatro desapareamientos conocidos. Otros han descrito el uso de la proteína MutS u otras enzimas de reparación de ADN para la detección de desapareamientos de una única base.

Se desvelan métodos alternativos para la detección de mutaciones de supresión, inserción o sustitución que pueden usarse en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.849.483, 5.851.770, 5.866.337, 5.925.525 y 5.928.870.

Pueden realizarse métodos de exploración para explorar un individuo con respecto a la aparición de las mutaciones identificadas anteriormente. Por ejemplo, se enseña en el presente documento que se toma una muestra (tal como sangre u otro fluido corporal o muestra celular o tisular) de un paciente para análisis genotípico. En una enseñanza ejemplar, el paciente es un paciente de cáncer. La presencia o ausencia de una o más mutaciones descritas en el presente documento determina la capacidad de los individuos explorados para resistir la terapia con un inhibidor de BRAF de primera generación. También se enseña que estos resultados se usarán para ajustar y/o alterar la dosis del inhibidor de BRAF de primera generación, o para seleccionar un ciclo de tratamiento usando un inhibidor de BRAF de segunda generación. El tratamiento eficaz de un sujeto que tiene cáncer puede comprender la erradicación de una célula cancerosa, el cese o la reducción de la velocidad de crecimiento del cáncer (tal como un tumor sólido), o el alivio de al menos un síntoma de cáncer.

Las mutaciones de resistencia en polipéptidos de BRAF, o en moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de BRAF, pueden detectarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, o modificaciones de los

mismos, incluyendo los métodos descritos posteriormente. Dichos métodos incluyen el uso de reacción en cadena de la polimerasa específica de alelos, secuenciación directa o indirecta del sitio, el uso de enzimas de restricción en el que los alelos respectivos del sitio crean o destruyen un sitio de restricción, el uso de sondas de hibridación específicas de alelo, el uso de anticuerpos que son específicos para polipéptidos de BRAF mutantes, o cualquier otra interpretación bioquímica.

1. Secuenciación de ADN

El método más habitualmente usado para caracterizar una mutación es secuenciación de ADN directa del locus genético que flanquea e incluye el polimorfismo. Dicho análisis puede conseguirse usando bien el "método de terminación de cadena mediada por dideoxi", también conocido como el "Método de Sanger" (Sanger, F., *et al.*, 1975) o el "método de degradación química", también conocido como "método de Maxam-Gilbert" (Maxam, A. M., *et al.*, 1977). La secuenciación en combinación con tecnologías de amplificación específicas de secuencia genómica, tales como la reacción en cadena de la polimerasa, puede utilizarse para facilitar la recuperación de los genes deseados (Mullis, K. *et al.*, 1986., Solicitud de Patente Europea 50.424; Solicitud de Patente Europea 84.796, Solicitud de Patente Europea 258.017, Solicitud de Patente Europea 237.362; Solicitud de Patente Europea 201.184; Patentes de Estados Unidos n.º 4.683.202; 4.582.788 y 4.683.194). También puede conseguirse secuenciación de muestras agrupadas usando secuenciación de Solexa/Illumina (Illumina® San Diego, CA), pirosecuenciación u otros enfoques de secuenciación de moléculas individuales.

2. Resistencia a exonucleasa

Otros métodos que pueden emplearse para determinar la identidad de un nucleótido presente en un sitio mutado utilizan un derivado de nucleótidos resistente a exonucleasa especializado (Patente de Estados Unidos n.º 4.656.127). Un cebador complementario de una secuencia alélica inmediatamente 3' del sitio polimórfico se hibrida con el ADN que se investiga. Si el sitio polimórfico en el ADN contiene un nucleótido que es complementario del derivado de nucleótidos resistente a exonucleótido particular presente, entonces ese derivado se incorporará por una polimerasa en el extremo del cebador hibridado. Dicha incorporación hace al cebador resistente a escisión por exonucleasa y de este modo permite su detección. Como se conoce la identidad del derivado resistente a exonucleótido, se puede determinar el nucleótido específico presente en el sitio polimórfico del ADN.

3. Métodos de microsecuenciación

Se han descrito varios otros procedimientos de incorporación de nucleótidos guiados por cebador para ensayar sitios mutados en ADN (Komher, J. S. *et al.*, 1989; Sokolov, B. P., 1990; Syvanen 1990; Kuppuswamy *et al.*, 1991; Prezant *et al.*, 1992; Ugozzoli, L. *et al.*, 1992; Nyren *et al.*, 1993). Estos métodos se basan en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para diferenciar entre bases en un sitio mutado. Como la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, las mutaciones que suceden en procesamientos del mismo nucleótido dan como resultado una señal que es proporcional a la longitud del procesamiento (Syvanen *et al.*, 1993).

4. Extensión en solución

La Patente Francesa 2.650.840 y la Solicitud de PCT n.º WO91/02087 analizan un método basado en solución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio mutado. De acuerdo con estos métodos, se usa un cebador complementario de secuencias alélicas inmediatamente 3' de un sitio polimórfico. La identidad del nucleótido de ese sitio se determina usando derivados de dideoxinucleótidos marcados que se incorporan en el extremo del cebador si son complementarios del nucleótido del sitio polimórfico.

5. Análisis por Genetic Bit™ o extensión de fase sólida

La Solicitud de PCT n.º 92/15712 describe un método que usa mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario de la secuencia 3' de un sitio polimórfico. El terminador marcado que se incorpora es complementario del nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana que se evalúa y está por lo tanto identificado. Aquí, el cebador de la molécula diana se inmoviliza en una fase sólida.

6. Ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA)

El ensayo de ligamientos de oligonucleótidos es un método de fase sólida que usa diferente metodología que la descrita anteriormente (Landegren *et al.*, 1988). Se utilizan dos oligonucleótidos capaces de hibridar con secuencias adyacentes de una única cadena de un ADN diana. Uno de estos oligonucleótidos está biotinilado mientras que el otro está marcado de forma detectable. Si se encuentra la secuencia complementaria precisa en una molécula diana, los oligonucleótidos hibridarán de modo que sus extremos estén adyacentes, y crean un sustrato de ligamiento. El ligamiento permite la recuperación del oligonucleótido marcado usando avidina. También se describen otros ensayos de detección de ácido nucleico, basándose en este método, combinado con PCR (Nickerson *et al.*, 1990). Aquí, se usa PCR para conseguir la amplificación exponencial de ADN diana, que después se detecta usando el OLA.

7. Análisis por Genetic Bit mediado por ligasa/polimerasa

La Patente de Estados Unidos n.º 5.952.174 describe un método que también implica dos cebadores capaces de hibridar con secuencias adyacentes de una molécula diana. El producto hibridado se forma en un soporte sólido en el que se inmoviliza la diana. Aquí la hibridación sucede de modo que los cebadores se separen entre sí por un espacio de un único nucleótido. La incubación de este producto hibridado en presencia de una polimerasa, una ligasa y una mezcla de nucleósidos trifosfato que contiene al menos un desoxinucleósido trifosfato permite el ligamiento de cualquier par de oligonucleótidos hibridados adyacentes. La adición de una ligasa da como resultado dos acontecimientos requeridos para generar una señal, extensión y ligamiento. Esto proporciona una mayor especificidad y menor "ruido" que los métodos que usan extensión o ligamiento solamente, y a diferencia de los ensayos basados en polimerasa, este método potencia la especificidad de la etapa de polimerasa combinándola con una segunda etapa de hibridación y una de ligamiento para unir una señal a la fase sólida.

8. Métodos de transferencia de ácido nucleico

Para algunos métodos de la presente invención, pueden emplearse métodos de transferencia de ácido nucleico. Se cree que los métodos adecuados para suministro de ácido nucleico para efectuar la expresión de composiciones de la presente invención incluyen prácticamente cualquier método por el que puede introducirse un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, incluyendo vectores virales y no virales) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como se conocería por un experto habitual en la materia. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, suministro directo de ADN tal como por inyección (Patentes de Estados Unidos n.º 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859, incluyendo microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; Patente de Estados Unidos n.º 5.789.215); por electroporación (Patente de Estados Unidos n.º 5.384.253); por precipitación de fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991); por bombardeo de microproyectiles (Solicitudes de PCT n.º WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de Estados Unidos n.º 5.610.042; 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler *et al.*, 1990; Patentes de Estados Unidos n.º 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de Estados Unidos n.º 5.591.616 y 5.563.055); por transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulleh *et al.*, 1993; Patentes de Estados Unidos n.º 4.684.611 y 4.952.500); o por captación de ADN mediada por inhibición/desecación (Potrykus *et al.*, 1985). Mediante la aplicación de técnicas tales como estas, pueden transformarse de forma estable o transitoria orgánulo u orgánulos, célula o células, tejido o tejidos u organismo u organismos.

9. Anticuerpos específicos de alelos

Pueden detectarse polipéptidos de BRAF que tienen una o más mutaciones de resistencia descritas en el presente documento usando anticuerpos que reconocen específicamente los polipéptidos de BRAF mutantes, pero no reconocen polipéptidos de BRAF de tipo silvestre. Pueden inducirse anticuerpos contra una o más formas alélicas de los polipéptidos de BRAF que tienen una o más mutaciones de resistencia. Se conocen bien técnicas para usar una proteína específica o un oligopéptido como un antígeno para inducir anticuerpos que reconozcan específicamente epítopos en el péptido o la proteína. En una realización, la secuencia de ADN de la forma alélica deseada del gen diana puede clonarse por inserción en un vector de expresión apropiado y traducirse a una proteína en una célula hospedadora procarionta o eucariota. La proteína puede recuperarse y usarse como un antígeno para inducir la producción de anticuerpos específicos. En otra realización, el ADN de la forma alélica deseada del gen diana se amplifica por tecnología de PCR y se traduce posteriormente *in vitro* a proteína para usar como el antígeno para inducir la producción de anticuerpos específicos. Una tercera realización es para usar la secuencia de ADN de los alelos alternativos como base para la generación de péptidos sintéticos que representen la secuencia de aminoácidos de los alelos para su uso como antígeno para inducir la producción de anticuerpos específicos.

Pueden generarse anticuerpos bien por técnicas de anticuerpos monoclonales convencionales o generarse mediante sistemas de expresión basados en recombinantes. Véase, en general, Abbas, Lichtman y Pober, *Cellular and Molecular Immunology*, W. B. Saunders Co. (1991). Se entiende que el término "anticuerpos" incluye moléculas de anticuerpos intactas así como fragmentos o derivados de anticuerpos, tales como Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse específicamente con un antígeno. Los anticuerpos producidos de este modo se unirán preferentemente solamente con la proteína mutante producida en forma alélica que se usó como un antígeno para crear el anticuerpo. También se describen métodos para generar anticuerpos específicos de alelos en la Patente de Estados Unidos n.º 6.200.754 y Patente de Estados Unidos n.º 6.054.273.

Dichos anticuerpos específicos para polipéptidos de BRAF mutantes pueden usarse para detectar la presencia de un polipéptido de BRAF que tenga una o más mutaciones de resistencia en una muestra, por ejemplo, una muestra de ensayo, una muestra celular, un extracto celular, una muestra biológica, o una muestra de paciente, usando técnicas conocidas en la materia. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, transferencia de Western, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia indirecta, y micromatrices de anticuerpos. Los anticuerpos que reconocen específicamente

polipéptidos de BRAF mutantes también pueden ser inhibidores de BRAF de segunda generación. La capacidad de un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido de BRAF mutante para inhibir la actividad biológica del polipéptido de BRAF mutante puede determinarse usando los métodos descritos en el presente documento para identificar inhibidores de BRAF de segunda generación.

IX. Aplicaciones de diagnóstico y exploración

Las técnicas anteriores pueden usarse para determinar la presencia o ausencia de una mutación de resistencia previamente identificada en una molécula de ácido nucleico o polipéptido de BRAF en una muestra obtenida de un paciente. La identificación de una molécula de ácido nucleico o polipéptido de BRAF mutante en una muestra de paciente puede ser útil para caracterizar una enfermedad o afección en el paciente. Por ejemplo, en un paciente que tenga una enfermedad asociada con expresión o activación aberrante de BRAF (por ejemplo, un cáncer), la identificación de una molécula de ácido nucleico o polipéptido de BRAF mutante en la muestra (por ejemplo, una muestra que contiene células cancerosas) obtenida del paciente indica que el paciente tiene un riesgo relativamente alto de recaída o falta de respuesta al tratamiento con un inhibidor de BRAF. Se enseña en el presente documento que la identificación de una molécula de ácido nucleico o polipéptido de BRAF que contiene una o más mutaciones descritas en el presente documento en una muestra que contiene células cancerosas obtenida de un paciente indica que el paciente tiene un riesgo relativamente alto de recaída o falta de respuesta al tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación, por ejemplo, RAF-265.

Un paciente que tiene una mutación de resistencia a BRAF descrita en el presente documento tiene un mayor riesgo de recaída del tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación que un paciente en el que no pueda detectarse una mutación de resistencia a BRAF. En consecuencia, como se usa en el presente documento, la expresión "riesgo relativamente alto de recaída" está en relación con un paciente en el que no puede detectarse una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF mutante. Es decir, un paciente que tiene un "riesgo relativamente alto de recaída" es un paciente que tiene un mayor riesgo de recaída en comparación con un paciente en el que no puede detectarse una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF mutante.

Como se enseña en el presente documento, la identificación de un polipéptido de BRAF, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF, que tiene una mutación en uno o más de los siguientes restos indica que el paciente tiene un riesgo relativamente alto de recaída o falta de respuesta al tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación, por ejemplo, RAF-265: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En divulgaciones ejemplares, la identificación de un polipéptido de BRAF, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF, que tiene una o más de las siguientes mutaciones de resistencia indica que el paciente tiene un riesgo relativamente alto de recaída o falta de respuesta al tratamiento con un inhibidor de BRAF, por ejemplo, RAF-265: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L o C748F.

La determinación de la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF mutante en una muestra de paciente también permite la selección de un régimen de tratamiento optimizado para el paciente, o estratificación del paciente a un cierto grupo de tratamiento. Se enseña en el presente documento un régimen de tratamiento que comprende el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación que se selecciona para un paciente en el que una muestra que contiene células cancerosas del paciente no contiene una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF mutante. Dicho paciente puede estratificarse en un régimen de tratamiento que comprende un inhibidor de BRAF de primera generación. El inhibidor de BRAF puede proporcionarse a dicho paciente a una dosificación convencional, a intervalos de dosificación convencionales.

También se enseña en el presente documento un régimen de tratamiento que comprende el tratamiento sin un inhibidor de BRAF que se selecciona para un paciente en el que una muestra que contiene células cancerosas del paciente contiene una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF mutante, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF que contiene una o más de las mutaciones descritas en el presente documento. Dicho paciente puede estratificarse en un régimen de tratamiento que no comprende un inhibidor de BRAF.

También se desvela un régimen de tratamiento que comprende tratamiento con una dosificación elevada de un inhibidor de BRAF de primera generación que se selecciona para un paciente en el que una muestra que contiene células cancerosas del paciente contiene una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF mutante. Dicho paciente puede estratificarse en un régimen de tratamiento que comprende una dosificación elevada de un inhibidor de BRAF de primera generación. En una enseñanza ejemplar, el inhibidor de BRAF de primera generación es RAF-265.

En una enseñanza alternativa, la identificación de una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF mutante en una muestra que contiene células cancerosas obtenidas de un paciente indica que el paciente probablemente responda al tratamiento con un inhibidor de BRAF de segunda generación. En consecuencia, se enseña en el presente documento un régimen de tratamiento que comprende el tratamiento con un inhibidor de BRAF de segunda

generación que se selecciona para un paciente en el que una muestra que contiene células cancerosas del paciente contiene una molécula de ácido nucleico o polipeptídica de BRAF mutante. Dicho paciente puede estratificarse en un régimen de tratamiento que comprende un inhibidor de BRAF de segunda generación.

En aspectos particulares de las realizaciones anteriores, el polipéptido de BRAF mutante tiene una mutación en uno o más de los siguientes restos: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En realizaciones ejemplares el polipéptido de BRAF mutante tiene una o más de las siguientes mutaciones: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F. En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico de BRAF mutante codifica un polipéptido de BRAF mutante que contiene una mutación en uno o más de los restos de aminoácidos anteriores.

En consecuencia, se enseña en el presente documento un método para optimizar el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, que comprende extraer ácido nucleico de células del cáncer; y secuenciar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF; en el que la presencia de nucleótidos que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido de BRAF codificado en relación con el aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, indica la necesidad de tratar al sujeto con un inhibidor de MEK o un inhibidor de RAF de segunda generación.

También se enseña en el presente documento un método para optimizar el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, que comprende extraer ácido nucleico de células del cáncer; y someter la muestra a PCR e identificar la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF; en el que la presencia de nucleótidos que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido de BRAF codificado en relación con el aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, indica la necesidad de tratar al sujeto con un inhibidor de MEK o un inhibidor de RAF de segunda generación.

También se desvela en el presente documento un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer, que comprende extraer ácido nucleico de células del cáncer; secuenciar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF; y administrar un inhibidor de MEK o un inhibidor de BRAF de segunda generación a un sujeto cuando la molécula de ácido nucleico contiene nucleótidos que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido de BRAF codificado en relación con el aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

También se desvela en el presente documento un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer, que comprende extraer ácido nucleico de células del cáncer; someter la muestra a PCR e identificar la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF; y administrar un inhibidor de MEK o un inhibidor de RAF de segunda generación al sujeto cuando la molécula de ácido nucleico contiene nucleótidos que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido de BRAF codificado en relación con el aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

Se enseña además en el presente documento un método para identificar un sujeto que tiene cáncer que probablemente se beneficie del tratamiento con un inhibidor de MEK o un inhibidor de RAF de segunda generación, que comprende: ensayar una muestra de ácido nucleico obtenida del cáncer con respecto a la presencia de una o más mutaciones en una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF que alteran la identidad de uno o más restos de aminoácidos del polipéptido de BRAF codificado en relación con el aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4; y correlacionar la presencia de la o las mutaciones en una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF con un sujeto que probablemente se beneficie del tratamiento con un inhibidor de MEK o un inhibidor de RAF de segunda generación.

Se desvela en el presente documento un método para identificar un sujeto que tiene cáncer que probablemente se beneficie del tratamiento con un inhibidor de MEK o un inhibidor de RAF de segunda generación, que comprende ensayar una muestra de ácido nucleico obtenida del cáncer con respecto a la presencia de una o más mutaciones en una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF que altera la identidad de uno o más restos de aminoácidos del polipéptido de BRAF codificado en relación con el aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329,

K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4; y correlacionar la presencia de la o las mutaciones en una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF con un sujeto que probablemente se beneficie del tratamiento con un inhibidor de MEK o un inhibidor de RAF de segunda generación.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores, el inhibidor de MEK es CI-1040, AZD6244, PD 318088, PD98059, PD334581, RDEA119, 6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-4-(4-fenoxi-fenilamino)-quinolina-3-carbonitrilo o 4-[3-cloro-4-(1-metil-1H-imidazol-2-ilsulfanil)-fenilamino]-6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinolina-3-carbonitrilo, o combinaciones de los mismos.

Se enseña en el presente documento un método para identificar que un sujeto que tiene cáncer tiene un alto riesgo de recaída durante el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación, que comprende extraer ácido nucleico de células del cáncer; y secuenciar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF; en el que la presencia de nucleótidos que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido de BRAF codificado en relación con el aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, identifica que el sujeto tiene un alto riesgo de recaída durante el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación.

También se enseña un método para identificar que un sujeto que tiene cáncer es insensible a tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación, que comprende extraer ácido nucleico de células del cáncer; y secuenciar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF; en el que la presencia de nucleótidos que alteran la identidad de un resto de aminoácido en uno o más aminoácidos del polipéptido de BRAF codificado en relación con el aminoácido en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, identifica al sujeto como insensible a tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación.

En diversas realizaciones de los aspectos anteriores, el inhibidor de RAF es RAF265 o PLX 4720. En algunas enseñanzas el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemias, linfomas, mielomas, carcinomas, carcinomas metastásicos, sarcomas, adenomas, cánceres del sistema nervioso y cánceres genitourinarios. En otras realizaciones, el cáncer es melanoma.

X. Métodos de Tratamiento

Se enseñan en el presente documento métodos para tratar a un sujeto que tiene un cáncer. En divulgaciones ejemplares, el sujeto tiene un cáncer que contiene un polipéptido de BRAF que tiene una o más mutaciones, por ejemplo, una o más de las mutaciones de resistencia descritas en el presente documento. En divulgaciones relacionadas, el sujeto tiene un cáncer que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF que tiene una o más mutaciones, por ejemplo, una o más de las mutaciones de resistencia descritas en el presente documento. El término "tratado", "tratando" o "tratamiento" incluye la disminución o alivio de al menos un síntoma asociado con la afección que se trate. Por ejemplo, el tratamiento puede ser disminución de uno o varios síntomas de un trastorno o erradicación completa de un trastorno, tal como cáncer. De forma similar, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto es una cantidad suficiente para disminuir o aliviar al menos un síntoma asociado con las afecciones que se tratan.

En consecuencia, se enseñan en el presente documento métodos para tratar a un sujeto que tiene un cáncer que comprenden administrar al sujeto un inhibidor de RAF de segunda generación. También se enseñan métodos para tratar a un sujeto que tiene un cáncer que comprenden administrar al sujeto un inhibidor de MEK. En algunas enseñanzas se identificaron en el cáncer una o más mutaciones en un polipéptido de BRAF, o en una molécula de ácido nucleico que codificaba un polipéptido de BRAF, lo que confiere resistencia a uno o más inhibidores de BRAF como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se enseña en el presente documento un método para tratar un cáncer que contiene sustituciones de aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones en BRAF, opcionalmente además de tener una mutación de BRAF en V600E: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de BRAF de segunda generación. También se enseña un método para tratar un cáncer que contiene sustituciones de aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones en BRAF, opcionalmente además de tener una mutación de BRAF en V600E: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de MEK. Como MEK se activa corriente abajo de RAF, un inhibidor de MEK puede inhibir con éxito la señalización de RAF en células que tienen una o más de las mutaciones de resistencia a REF descritas en el presente documento.

Los inhibidores de MEK adecuados para practicar la invención incluyen, pero sin limitación, I-1040, AZD6244, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119, 6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-4-(4-fenoxi-fenilamino)-quinolina-3-carbonitrilo, 4-[3-cloro-4-(1-metil-1H-imidazol-2-ilsulfanil)-fenilamino]-6-metoxi-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinolina-3-carbonitrilo y el compuesto de Roche RG7420. Los inhibidores de MEK adicionales adecuados para practicar la invención incluyen, pero sin limitación, los compuestos descritos en los documentos WO 2008076415, US 20080166359, WO 2008067481, WO 2008055236, US 20080188453, US 20080058340, WO 2007014011, WO 2008024724, US 20080081821, WO 2008024725, US 20080085886, WO 2008021389, WO 2007123939, US 20070287709, WO 2007123936, US 20070287737, US 20070244164, WO 2007121481, US 20070238710, WO 2007121269, WO 2007096259, US 20070197617, WO 2007071951, EP 1966155, IN 2008MN01163, WO 2007044084, AU 2006299902, CA 2608201, EP 1922307, EP 1967516, MX 200714540, IN 2007DN09015, NO 2007006412, KR 2008019236, WO 2007044515, AU 2006302415, CA 2622755, EP 1934174, IN 2008DN02771, KR 2008050601, WO 2007025090, US 20070049591, WO 2007014011, AU 2006272837, CA 2618218, EP 1912636, US 20080058340, MX 200802114, KR 2008068637, US 20060194802, WO 2006133417, WO 2006058752, AU 2005311451, CA 2586796, EP 1828184, JP 2008521858, US 20070299103, NO 2007003393, WO 2006056427, AU 2005308956, CA 2587178, EP 1838675, JP 2008520615, NO 2007003259, US 20070293544, WO 2006045514, AU 2005298932, CA 2582247, EP 1802579, CN 101065358, JP 2008517024, IN 2007DN02762, MX 200704781, KR 2007067727, NO 2007002595, JP 2006083133, WO 2006029862, US 20060063814, US 7371869, AU 2005284293, CA 2579130, EP 1791837, CN 101023079, JP 2008513397, BR 2005015371, KR 2007043895, MX 200703166, IN 2007CN01145, WO 2006024034, AU 2005276974, CA 2578283, US 20060079526, EP 1799656, CN 101044125, JP 2008510839, MX 2007022208, IN 2007DN02041, WO 2006018188, AU 2005274390, CA 2576599, EP 1781649, CN 101006085, JP 2008509950, BR 2005014515, AT 404556, US 20060041146, MX 200701846, IN 2007CN00695, KR 2007034635, WO 2006011466, AU 2005265769, CA 2575232, EP 1780197, BR 2005013750, JP 4090070, MX 200700736, CN 101124199, KR 2007041752, IN 2007DN01319, WO 2005121142, AU 2005252110, CA 2569850, US 20060014768, US 7378423, EP 1761528, CN 101006086, AT 383360, BR 2005011967, JP 2008501631, EP 1894932, ES 2297723, MX 2006PA14478, NO 2007000155, IN 2007CN00102, KR 2007034581, HK 1107084, JP 2008201788, US 20050256123, US 20050250782, US 20070112038, US 20050187247, WO 2005082891, WO 2005051302, AU 2004293019, CA 2546353, US 20050130943, US 20050130976, US 20050153942, EP 1689233, JP 2007511615, WO 2005051301 AU 2004293018, CA 2545660, US 20050130943, US 20050130976, US 20050153942, EP 1682138, BR 2004016692, CN 1905873, JP 2007511614, MX 2006PA05657, IN 2006DN03183, NO 2006002692, KR 2007026343, WO 2005028426, EP 1674452, US 20070105859, US 20050054701, US 7230099, US 20050049419, US 7144907, AU 2004270699, CA 2537321, WO 2005023759, EP 1673339, BR 2004014111, CN 1874769, JP 2007504241, JP 4131741, US 20060030610, MX 2006PA02466, NO 2006001506, US 20050049419, US 7144907, US 20050054701, US 7230099, AU 2004270699, CA 2537321, WO 2005023759, EP 1673339, BR 2004014111, CN 1874769, JP 2007504241, JP 4131741 US 20060030610, MX 2006PA02466, IN 2006DN01661, NO 2006001506, US 20060189808, US 20060189649, US 7271178, US 20060189668, US 20050049276, WO 2005009975, CA 2532067, EP 1651214, BR 2004012851, JP 20060528621, US 20050026970, US 7160915, MX 2006PA00921, WO 2005007616, US 20050059710, WO 2005000818, US 20050026964, US 7273877, WO 2004056789, US 20050004186, CA 2509405, AU 2003286306, EP 1578736, BR 2003017254, JP 2006516967, MX 2005PA06803, WO 2004044219, AU 2003291268, WO 2004041811, AU 2003278369, EP 1575943, JP 2006508944, US 20050282856, US 7173136, US 20070191346, WO 2004041185, AU 2003287366, US 20060270643, WO 2004030620, AU 2003275282, US 20040092514, US 7232826, EP 1545529, US 20040039037, US 6989451, WO 2003077855, CA 2478534, AU 2003220202, US 20030216460, EP 1482944, CN 1652792, JP 2005526076, RU 2300528, BR 2003006016, MX 2004PA08894, US 20060106225, WO 2003062191, CA 2473545, EP 1467968, BR 2003007060, JP 2005515253, TW 592692, US 20040006245, US 6891066, MX 2004PA05527, US 20050137263, US 7078438, WO 2003062189, CA 2472367, EP 1467965, BR 2003007071, JP 2005515251, US 20030232889, US 6770778, MX 2004PA05528, WO 2003047585, AU 2002347360, WO 2003047583, AU 2002365665, WO 2003047523, CA 2466762, AU 2002365899, US 20030125359, US 7307071, JP 2005526008, EP 1578346, WO 2003035626, CA 2463101, AU 2002359291, EP 1438295, JP 2005508972, US 20050054706, US 7253199, US 20070293555, AU 2008202731, US 6506798, WO 9901421, WO 2000041994, US 6310060, WO 2002006213, CA 2416685, AU 2001073498, BR 2001012584, HU 2003002781, JP 2004504294, JP 3811775, EE200300030, NZ 524120, AU 2001273498, IN 2003MN00028, NO 2003000249, KR 773621, MX 2003PA00591, HR 2003000083, BG 107564, ZA 2003000348, US 20040054172, US 6960614, HK 1055943, US 20050176820, US 7411001, WO 2000042029, JP 2000204077, CA 2355374, EP 1144394, BR 9916896, TR 200102029, HU 2001005092, JP 2002534515, EE 200100374, NZ 513432, AT 302761, ES 2249060, ZA 2001005219, MX 2001PA06659, IN 2001MN00785, NO 2001003451, HR 2001000525, BG 105801, US 6545030, HK 1042488, US 20030004193, WO 2000042022, JP 2000204079, CA 2355470, EP 1144385, BR 9916904, TR 200102030, HU 2001005113, EE 200100373, JP 2002534510, NZ 513433, AT 302193, ES 2247859, MX 2001PA06568, ZA 2001005224, IN 2001MN00786, US 6469004, NO 2001003452, HR 2001000524, BG 105800, WO 2000042003, JP 2000212157, CA 2349832, EP 1144371, BR 9916885, AT 309205, ES 2252996, MX 2001PA04332, US 6440966, US 20030092748, US 6750217, WO 2000042002, JP 2000204075, CA 2349467, EP 1144372, BR 9916894, JP 2002534497, AT 311363, ES 2251851, MX 2001PA04331, US 6455582, US 20030045521, US 6835749, WO 2000037141, CA 2352326, BR 9916839, EP 1140291, TR 200101871, HU 2001004844, JP 2002532570, EE 200100339, NZ 512859, AT 310567, ES2253928, AU 2001004277, MX 2001PA05476, IN 2001MN00673, NO 2001003099, HR 2001000473, BG 105715, US 20040171632, GB 2323845, WO 9901426, CA 2290506, AU 9882627, AU 757046, EP 993439, BR 9810366, NZ 501276, HU 2000003731, JP 2002511092, AT 277895, IL 132840, PT 993439, ES 2229515, TW 396149, ZA 9805728, MX 9910649, NO

9906491, NO 315271, US 20030078428, US 6821963, US 20050049429, US 20060052608, US 7169816, WO 9901421, CA 2290509, AU 9882626, AU 756586, EP 993437, BR 9810385, JP 2002509536, NZ 501277, AT 344791, ES 2274572, TW 221831, ZA 9805726, MX 9910556, US 6310060, US 6506798, US 20020022647, US 6492363, US 20030149015 y US 7019033.

Se conocen en la técnica dosificaciones, formulaciones y modos de administración de los compuestos anteriores. Los modos ejemplares de administración incluyen, pero sin limitación, oral, subcutánea, intravenosa o parenteral. Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden incluir, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, etil carbonato, etil acetato, alcohol bencílico, benzil benzoato, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), cremafor, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, saporíferos y agentes perfumantes. Las formas de dosificación sólida para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólida, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, e) agentes retardantes de solución tales como parafina, f) acelerantes de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y glicerol monoestearato, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico y mezclas de los mismos, y (j) potenciadores de la tasa de disolución como polietilenglicoles de alto peso molecular o polivinilpirrolidona en mezclas físicas o en forma de dispersiones sólidas. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

Debido a que las mutaciones en BRAF potencial ampliamente la resistencia en varios tipos de cáncer, los métodos e inhibidores de BRAF de segunda generación descritos en el presente documento son útiles en el tratamiento de un amplio espectro de cánceres, incluyendo tumores sólidos y tumores malignos hematológicos. Los ejemplos de dichos tumores incluyen pero sin limitación leucemias, linfomas, mielomas, carcinomas, carcinomas metastásicos, sarcomas, adenomas, cánceres del sistema nervioso y cánceres genitourinarios. Se enseña en el presente documento que los métodos anteriores son útiles en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda pediátrica y del adulto, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer de conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, osteosarcoma, histiocitoma fibroso, cáncer de cerebro, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebelar, glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico, cáncer de mama, cáncer de mama masculino, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, carcinoma de origen desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebelar, glioma maligno, cáncer de cuello uterino, cánceres de la infancia, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer colorrectal, linfoma de linfocitos T cutáneo, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, tumores de la familia de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer del conducto biliar extrahepático, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales ováricas, tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia por tricoleucitos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, glioma de la ruta visual e hipotalámico, tumores de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de células renales, cáncer laríngeo, cáncer de cavidad oral y labios, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma del sistema nervioso central primario, macroglobulinemia de Waldenstrom, histiocitoma fibroso maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, cáncer de cuello escamoso, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, trastornos mieloproliferativos, trastornos mieloproliferativos crónicos, cavidad nasal y cáncer del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de paratiroides, cáncer peneano, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de la hipófisis, neoplasias de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, rabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma de tejido blando, sarcoma uterino, síndrome de Sezary, cáncer de piel no melanoma, cáncer del intestino delgado, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales, tumores trofoblásticos, cáncer uretral, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar y tumor de Wilms.

XI. Kits

Pueden ensamblarse diversos kits como se enseña en el presente documento. Un kit puede contener componentes para ensayar con respecto a mutaciones en BRAF para evaluar a un paciente particular con respecto al riesgo de desarrollar resistencia a terapia usando un inhibidor de BRAF, y permitir de este modo que un especialista clínico determine si es necesario un tratamiento alternativo para el paciente. Dichos kits pueden contener reactivos que permiten evaluar mutaciones, tales como conjuntos de cebadores para evaluar mutaciones correlacionadas con manifestaciones fenotípicas relevantes con respecto a la resistencia a un inhibidor de BRAF (por ejemplo, RAF-265). Se contempla que los cebadores (o pares de cebadores) que son complementarios de o idénticos a toda o parte de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, pueden ser parte de un kit. Como se desvela en el presente documento, los cebadores pueden usarse para detectar específicamente o amplificar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF mutante que contiene una mutación en uno o más de los siguientes restos de aminoácidos: A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. En divulgaciones ejemplares, los cebadores detectan específicamente o amplifican una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BRAF que contiene una o más de las siguientes mutaciones: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F. También se enseña que los kits contienen instrucciones para usar cebadores que son complementarios o idénticos de toda o parte de SEQ ID NO: 1 para amplificar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de BRAF.

Se enseña además que los kits comprenden composiciones para detectar una mutación que comprende un polipéptido de BRAF, tal como un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido de BRAF mutante que contiene una o más mutaciones de resistencia. Los polipéptidos ejemplares incluyen un polipéptido de BRAF mutante que contiene una mutación en uno o más de los siguientes restos de aminoácidos: A29, H72, S 113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748. Se enseña además que el polipéptido de BRAF mutante contiene una o más de las siguientes mutaciones: A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

Todos los materiales esenciales y reactivos requeridos para ensayar con respecto a mutaciones de BRAF por un método particular analizado anteriormente pueden ensamblarse también juntos en un kit. Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida es preferentemente una solución acuosa, siendo una solución acuosa estéril particularmente preferida.

Los componentes del kit también pueden proporcionarse en formas secas o liofilizadas. Cuando se proporcionan reactivos o componentes como una forma seca, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también puede proporcionarse en otro medio contenedor.

Los kits enseñados en el presente documento también típicamente incluirán un medio para contener los viales en confinamiento estrecho para venta comercial tal como, por ejemplo, inyección o recipientes de plástico o moldeados por soplado en los que se conservan los viales deseados. Independientemente del número o tipo de recipientes, los kits de la invención también pueden comprender, o envasarse con, un instrumento para ayudar a la recogida y evaluación de muestras. Dicho instrumento puede ser, por ejemplo, un inhalante, una jeringa, una pipeta, un fórceps, una cuchara medida, un frasco para colirio o cualquier otro vehículo de suministro médicamente aprobado.

Los kits enseñados en el presente documento también pueden incluir una hoja de instrucciones que perfile terapias alternativas sugeridas cuando se identifiquen en un paciente mutaciones particulares. Por ejemplo, una hoja de instrucciones incluida con los kits de la invención puede recomendar que un paciente que tenga un trastorno, por ejemplo, un cáncer, en el que se ha identificado un polipéptido de BRAF mutante, interrumpa el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación, se supervise con respecto a recaída durante el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación, continúe el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación a una dosificación elevada, o inicie el tratamiento con un inhibidor de BRAF de segunda generación. Una hoja de instrucciones incluida con los kits enseñados en el presente documento puede recomendar de forma similar que un paciente que tenga un trastorno en el que no sea detectable un polipéptido de BRAF mutante continúe con el tratamiento con un inhibidor de BRAF de primera generación a una dosificación convencional. En enseñanzas ejemplares, el inhibidor de BRAF de primera generación es RAF-265.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no debería interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Exploración de mutagénesis aleatoria de BRAF-VE600E (RAF265 y PLX4720)

Se consiguió generación de bibliotecas mutadas usando una modificación de métodos publicados. Brevemente, se realizó mutagénesis propagando un plásmido de expresión de BRAF(V600E) (pWZL-Blast-BRAF(V600E)) en *E. coli*

deficiente para los genes de reparación de ADN MutS, MutD5- y MutT- DNA (XL1-Red; Stratagene). Se extrajo ADN plasmídico de estas bacterias y se amplificó en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene). El plásmido de BRAF(V600E) mutado o control no mutado se usó para infectar células de un melanoma A375. Después de selección con blasticidina, las células se sembraron en placas de 15 cm y se cultivaron en presencia de inhibidores de RAF (RAF265 o PLX4720; 2 μ M o 1,5 μ M respectivamente) durante 5 semanas hasta que surgieron clones resistentes. Se secuenciaron clones resistentes para identificar mutaciones que aparecían con alta frecuencia. Los resultados se muestran en la Figura 5 (exploración de RAF265) y la Figura 6 (exploración de PLX4720). La Figura 7 representa las localizaciones de tres mutaciones de BRAF que surgieron con alta frecuencia en ambas exploraciones.

Ejemplo 2: Análisis de transferencia de Western de activación de pMEK1/2 y pERK1/2 en células que contienen mutantes de BRAF

Se transfectaron células 293 T con 6 μ g de pWZL(BLAST)-BRAF para cada alelo de resistencia potencial y posteriormente se trataron con una serie de concentraciones del inhibidor de BRAF(V600E) PLX4720 (0, 0,08, 0,4, 2, 5 y 10 μ M) durante 16 horas. Se realizaron estudios de inmunotransferencia usando procedimientos convencionales. Brevemente, las células tratadas se lisaron con tampón de TNN que contenía inhibidor de proteasa (Roche), NaF y NaVO₃ (1 mM cada uno). Los lisados se cuantificaron (ensayo de Bradford), se desnaturalizaron (95 °C) y se resolvieron por electroforesis en gel de SDS. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se exploraron con anticuerpos primarios que reconocían BRAF (Santa Cruz; dilución 1:10.000), p-ERK1/2, p-MEK1/2 (Ser-217/221), y α -tubulina (Cell Signaling Technology; dilución 1:1.000). Después de incubar con el anticuerpo secundario apropiado (IgG anti-conejo o anti-ratón, ligado a HRP; dilución 1:1.000) (Cell Signaling Technology), se detectaron proteínas usando quimioluminiscencia (Pierce). Los resultados se muestran en la Figura 8. Como se muestra en la misma, los niveles de MEK1/2 y ERK1/2 fosforiladas aumentan en células que contienen BRAF-V600E, BRAF-V600E-T521K, y BRAF V600E-P686Q. El aumento de MEK1/2 y ERK1/2 fosforiladas se mantiene en células BRAF-V600E-T521K y BRAF V600E-P686Q en presencia de concentraciones crecientes de PLX4720.

Ejemplo 3: Ensayo de quinasa de BRAF

Se transfectaron células 293T (confluyentes al 70 %) con 15 μ g de pc-DNA-DEST40 que contenía alelos de resistencia potenciales de BRAF(V600E), BRAF sin actividad quinasa o de tipo silvestre. A las 48 h después de la infección, se generaron lisados por métodos convencionales. Se realizó precipitación usando perlas de cobalto durante 30 min a 4 °C en 1 mg de extracto celular. Las perlas de cobalto unidas a proteínas se incubaron con 20 μ l de mezcla de ATP/magnesio (Mops 20 mM pH 7,2, β -glicerofosfato 25 mM, EGTA 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 75 mM y ATP 0,5 mM), 20 μ l de tampón de dilución (Mops 20 mM pH 7,2, β -glicerofosfato 25 mM, EGTA 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, DTT 1 mM) y 1 μ g de MEK1 inactiva (obtenida de Millipore) durante 30 min a 30 °C. El producto de MEK1 fosforilada se detectó por inmunotinción usando un anticuerpo de p-MEK1/2 (Cell Signaling Technology).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
- <120> MUTACIONES DE BRAF QUE CONFIEREN RESISTENCIA A INHIBIDORES DE BRAF
- <130> 52930/09137
- <140> Nueva solicitud
- <141> Simultáneamente con la presente
- <150> 61/308.275
- <151> 25-02-2010
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 2949
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 576 061 T3

cgctccctt cccctcccc gcccgacagc ggcogctcgg gccccggctc toggttataa	60
gatggcggcg ctgagcgggtg gcggtggtgg cggcgcggag ccgggccagg ctctgttcaa	120
cggggacatg gagccccgagg ccggcgcccg cgcggggccc gcggcctctt cggctgcgga	180
ccctgccatt ccggaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga cacaggaaca	240
tatagaggcc ctattggaca aatttgggtg ggagcataat ccaccatcaa tatactctgga	300
ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgcactcaa caaagagaac aacagttatt	360
ggaatctctg gggaaacgga ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa tggataccgt	420
tacatcttct tctcttcta gcctttcagt gctacctca tctctttcag tttttcaaaa	480
tcccacagat gtggcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aacctatcg ttagagtctt	540
cctgcccac aaacagagga cagtgtacc tgcaagggtg ggagttacag tccgagacag	600
tctaaagaaa gcaactgatg tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg tttacagaat	660
tcaggatgga gagaagaaac caattggtg ggacactgat atttctggc ttactggaga	720
agaattgcat gtggaagtgt tggagaatgt tocacttaca acacacaact ttgtacgaaa	780
aacgtttttc accttagcat tttgtgactt ttgtcgaaag ctgcttttcc agggtttccg	840
ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaagttc cactgatgtg	900
tgtaattat gaccaacttg atttgetgtt tgtctccaag ttctttgaac accaccaat	960
accacaggaa gaggcgtcct tagcagagac tgccctaaca tctggatcat ccccttccgc	1020
acccgcctcg gactctattg gccccaaat tctcaccagt ccgtctcctt caaaatccat	1080
tccaattcca cagcccttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcaat ttgggcaacg	1140
agaccgatcc tcatcagctc ccaatgtgca tataaacaca atagaacctg tcaatattga	1200
tgacttgatt agagaccaag gatttcgtgg tgatggagga tcaaccacag gtttgtctgc	1260

ES 2 576 061 T3

tacccccoct gcctcattac ctggctcact aactaacgtg aaagccttac agaaatctcc	1320
aggacctcag cgagaaagga agtcatcttc atcctcagaa gacaggaatc gaatgaaaac	1380
acttggtaga cgggactcga gtgatgattg ggagattcct gatgggcaga ttacagtggg	1440
acaaagaatt ggatctggat catttggaac agtctacaag ggaaagtggc atgggtgatgt	1500
ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc tacacctcag cagttacaag ccttcaaaaa	1560
tgaagtagga gtactcagga aaacacgaca tgtgaatata ctactottca tgggctattc	1620
cacaaagcca caactggcta ttggtaccca gtgggtgtgag ggctccagct tgtatcacca	1680
tctccatatac attgagacca aatttgagat gatcaaaactt atagatattg cacgacagac	1740
tgacagggc atggattact tacacgcaa gtcaatcacc cacagagacc tcaagagtaa	1800
taatataattt ctctatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc tagctacagt	1860
gaaatctoga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatoca ttttgtggat	1920
ggcaccagaa gtcacagaa tgcaagataa aaatocatac agctttcagt cagatgtata	1980
tgcatttgga attgtttgt atgaattgat gactggacag ttaccttatt caaacatcaa	2040
caacagggac cagataattt ttatgggtggg acgaggatac ctgtctccag atctcagtaa	2100
ggtacggagt aactgtcca aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa	2160
aagagatgag agaccactct ttccccaaat tctogcctct attgagctgc tggeccgctc	2220
attgccaaaa attcacgca gtgcatcaga acctccttg aatcgggctg gtttccaaac	2280
agaggatattt agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccatccagg cagggggata	2340
tggtgcgttt cctgtccact gaaacaaatg agtgagagag ttcaggagag tagcaacaaa	2400
aggaaaataa atgaacatat gtttgcttat atgttaaatt gaataaata ctctctttt	2460
ttttaaggty aaccaaagaa cacttggtgt gttaaagact agatataatt ttccccaaa	2520
ctaaaattta tacttaacat tggattttta acatccaagg gttaaaatac atagacattg	2580
ctaaaattg gcagagctc ttctagaggc tttactttct gttccgggtt tgtatcattc	2640
acttggttat ttaagtatg aaacttcagt ttctcatgca acttttgttg ccagctatca	2700
catgtccact aggactcca gaagaagacc ctacctatgc ctgtgtttgc aggtgagaag	2760
ttggcagtcg gttagcctgg gttagataag gcaaaactgaa cagatctaat ttaggaagtc	2820
agtagaattt aataattcta ttattattct taataatttt tctataacta tttcttttta	2880
taacaatttg gaaatgtgg atgtctttta tttccttgaa gcaataaact aagtttcttt	2940
ttataaaaa	2949

<210> 2
 <211> 766
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

ES 2 576 061 T3

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly
20 25 30

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp
35 40 45

Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu
50 55 60

Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu
65 70 75 80

Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu
85 90 95

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val
130 135 140

Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe
145 150 155 160

Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr
165 170 175

Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro
180 185 190

Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile
195 200 205

Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val
210 215 220

Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys
225 230 235 240

Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe
245 250 255

ES 2 576 061 T3

Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys
 260 265 270

Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu
 275 280 285

Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu
 290 295 300

Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala
 305 310 315 320

Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro
 325 330 335

Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp
 340 345 350

His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn
 355 360 365

Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg
 370 375 380

Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu
 405 410 415

Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser
 420 425 430

Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp
 435 440 445

Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly
 450 455 460

Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val
 465 470 475 480

Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln
 485 490 495

Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn
 500 505 510

Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val

<210> 3
<211> 2949
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 576 061 T3

cgctccctt cccctcccc gcccgacagc ggcgctcgg gcccggctc tcggttataa 60
 gatggcggcg ctgagcggtg gcgggtggtg cggcgcgagg ccgggcccagg ctctgttcaa 120
 cggggacatg gagcccgagc ccggcgccgg cgcgggcgcc ggggcctott cggctgcgga 180
 ccctgccatt ccggaggagc tgtggaatat caaacaaatg attaagttga cacaggaaca 240
 tatagaggcc ctattggaca aatttggtg gggagcataat ccaccatcaa tatactgga 300
 ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgcactcaa caaagagaac aacagttatt 360
 ggaatctctg gggaacggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa tggataccgt 420
 tacatcttct tctcttcta gcctttcagt gctaccttca tctctttcag tttttcaaaa 480
 tcccacagat gtggcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg ttagagtctt 540
 cctgcccaac aaacagagga cagtggtagc tgcaagggtg ggagttacag tccgagacag 600
 tctaaagaaa gcaactgatg tgagaggtct aatccagag tgctgtgctg tttacagaat 660
 tcaggatgga gagaagaaac caattggtg ggacactgat atttcctggc ttactggaga 720
 agaattgcat gtggaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact ttgtacgaaa 780
 aacgtttttc accttagcat tttgtgactt ttgtcgaaag ctgcttttcc agggtttccg 840
 ctgtcaaaaa tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaagttc cactgatgtg 900
 tgtaattat gaccaacttg atttgctggt tgtctccaag ttctttgaa accaccaat 960
 accacaggaa gagcgtcct tagcagagac tgccctaaca tctggatcat cccttccgc 1020
 accgcctcg gactctattg ggcccaaat tctcaccagt ccgtctcctt caaaatccat 1080
 tccaattcca cagcccttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcaat ttgggcaacg 1140
 agaccgatcc tcatcagctc ccaatgtgca tataaacaca atagaacctg tcaatattga 1200
 tgacttgatt agagaccaag gatttcgtgg tgatggagga tcaaccacag gtttctctgc 1260
 tccccccct gcctcattac ctggctcact aactaacgtg aaagccttac agaaatctcc 1320
 aggacctcag cgagaaagga agtcatcttc atcctcagaa gacaggaatc gaatgaaaac 1380
 acttggtaga cgggactoga gtgatgattg ggagattcct gatgggcaga ttacagtggg 1440
 acaaagaatt ggatctggat catttggaac agtctacaag ggaaagtggc atggtgatgt 1500
 ggcagtgaaa atggtgaatg tgacagcacc tacacctcag cagttacaag ccttcaaaaa 1560
 tgaagtagga gtactcagga aaacacgaca tgtgaatata ctactottca tgggtattc 1620
 caaaaagcca caactggcta ttggtacca gtggtgtgag ggctccagct tgtatcacca 1680
 tctccatata attgagacca aatttgagat gatcaaatc atagatattg cacgacagac 1740
 tgcacagggc atggattact tacacgcaa gtcaatcctc cacagagacc tcaagagtaa 1800
 taatatattt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc tagctacaga 1860

ES 2 576 061 T3

gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca ttttgtggat 1920
 ggcaccagaa gtcatcagaa tgcaagataa aaatccatac agctttcagt cagatgtata 1980
 tgcatttggga attgttctgt atgaattgat gactggacag ttaccttatt caaacatcaa 2040
 caacagggac cagataatth ttatgggtggg acgaggatac ctgtctccag atctcagtaa 2100
 ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa 2160
 aagagatgag agaccactct ttcccaaat tctgcctct attgagctgc tggcccgctc 2220
 attgcaaaaa attcaaccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg gtttccaaac 2280
 agaggattht agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccatccagg cagggggata 2340
 tgggtgcgtht cctgtccact gaaacaaatg agtgagagag ttcaggagag tagcaacaaa 2400
 aggaaaataa atgaacatat gtttgcttat atgttaaatt gaataaaata ctctcttht 2460
 thttaaggthg aaccaaagaa cacttgtgthg gttaaagact agatataatt thtcccaaaa 2520
 ctaaaattht tacttaacat tggatthttht acatccaagg gttaaaatac atagacattg 2580
 ctaaaaattg gcagagcctc ttctagaggc thtactthtct gttccgggtht tgtatcattc 2640
 acttggthtatt thtaagthg aaacttcagtht thtctcatgca actthtthtthg ccagctatca 2700
 catgtccact agggactcca gaagaagacc ctacctatgc ctgtgthtthg aggtgagaag 2760
 thtggcagthg gthtagcctg gthtagataag gcaaaactgaa cagatctaat thtaggaagthc 2820
 agthagaattht aataatthtct thattatthtct taataattht thtataacta thtctthttht 2880
 taacaatthtthg gaaaatgthg atgtctthttht thtctthtthg gcaataaact aagthtcttht 2940
 thtataaaaa 2949

<210> 4
 <211> 766
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 20 25 30
 Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp
 35 40 45
 Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu
 50 55 60
 Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

ES 2 576 061 T3

Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu
85 90 95

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val
130 135 140

Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe
145 150 155 160

Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr
165 170 175

Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro
180 185 190

Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile
195 200 205

Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val
210 215 220

Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys
225 230 235 240

Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe
245 250 255

Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys
260 265 270

Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu
275 280 285

Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu
290 295 300

Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala
305 310 315 320

Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro
325 330 335

ES 2 576 061 T3

Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp
 340 345 350
 His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn
 355 360 365
 Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg
 370 375 380
 Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu
 405 410 415
 Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser
 420 425 430
 Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp
 435 440 445
 Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly
 450 455 460
 Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val
 465 470 475 480
 Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln
 485 490 495
 Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn
 500 505 510
 Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val
 515 520 525
 Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile
 530 535 540
 Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr
 545 550 555 560
 Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp
 565 570 575
 Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile
 580 585 590
 Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Glu Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His

ES 2 576 061 T3

595		600		605											
Gln	Phe	Glu	Gln	Leu	Ser	Gly	Ser	Ile	Leu	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Val
610						615					620				
Ile	Arg	Met	Gln	Asp	Lys	Asn	Pro	Tyr	Ser	Phe	Gln	Ser	Asp	Val	Tyr
625					630					635					640
Ala	Phe	Gly	Ile	Val	Leu	Tyr	Glu	Leu	Met	Thr	Gly	Gln	Leu	Pro	Tyr
				645					650					655	
Ser	Asn	Ile	Asn	Asn	Arg	Asp	Gln	Ile	Ile	Phe	Met	Val	Gly	Arg	Gly
			660					665					670		
Tyr	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Arg	Ser	Asn	Cys	Pro	Lys	Ala
		675					680					685			
Met	Lys	Arg	Leu	Met	Ala	Glu	Cys	Leu	Lys	Lys	Lys	Arg	Asp	Glu	Arg
	690					695						700			
Pro	Leu	Phe	Pro	Gln	Ile	Leu	Ala	Ser	Ile	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Ser
705					710					715					720
Leu	Pro	Lys	Ile	His	Arg	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Ser	Leu	Asn	Arg	Ala
				725					730					735	
Gly	Phe	Gln	Thr	Glu	Asp	Phe	Ser	Leu	Tyr	Ala	Cys	Ala	Ser	Pro	Lys
			740					745					750		
Thr	Pro	Ile	Gln	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ala	Phe	Pro	Val	His		
		755					760					765			

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de BRAF mutante que tiene una actividad de BRAF, en la que dicho polipéptido de BRAF mutante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido de BRAF V600E (SEQ ID NO: 4), confiriendo la al menos una sustitución de aminoácido resistencia a uno o más inhibidores de BRAF en el polipéptido de BRAF mutante, el inhibidor de BRAF seleccionado de RAF-265 o PLX4720, en el que la al menos una sustitución de aminoácido sucede en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748.

2. Un polipéptido de BRAF mutante aislado que tiene una actividad de BRAF, en el que dicho polipéptido de BRAF mutante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido de BRAF V600E (SEQ ID NO: 4), confiriendo la al menos una sustitución de aminoácido resistencia a uno o más inhibidores de BRAF en el polipéptido de BRAF mutante, el inhibidor de BRAF seleccionado de RAF-265 o PLX4720, en el que la al menos una sustitución de aminoácido sucede en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A29, H72, S113, S124, P162, C194, L227, P231, C251, V291, Q329, K483, L485, T521, V528, D587, P655, S657, S683, P686, C696, L697, P722, F738 y C748.

3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o el polipéptido de BRAF mutante de la reivindicación 2, en el que la al menos una sustitución de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en A29V, H72N, S113I, S124F, P162H, C194*, L227F, P231T, C251F, V291F, Q329K, K483E, L485F, T521K, V528F, D587E, P655T, S657*, S683R, P686Q, P686T, C696*, L697I, P722T, F738L y C748F.

4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o el polipéptido de BRAF mutante de la reivindicación 2, en el que el polipéptido de BRAF mutante es un polipéptido de BRAF que comprende una sustitución en una o más de las posiciones de aminoácidos T521K, V528F o P686Q.

5. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 5.

7. Un método para producir un polipéptido de BRAF mutante que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 6 de modo que la célula produzca un polipéptido de BRAF mutante.

8. Un método para identificar un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer, que comprende:

- (a) proporcionar una composición de ensayo que comprende un polipéptido de BRAF mutante de la reivindicación 2 y un sustrato de BRAF;
- (b) poner en contacto la composición de ensayo con un compuesto de ensayo en condiciones que permitan la fosforilación del sustrato de BRAF en ausencia del compuesto ensayo; y
- (c) determinar el efecto del compuesto en la fosforilación del sustrato de BRAF;

en el que la modulación negativa de fosforilación del sustrato de BRAF en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer, y preferentemente la modulación negativa de la fosforilación del sustrato de BRAF en comparación con un control adecuado identifica al compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación.

9. El método de la reivindicación 8, en el que el sustrato de BRAF es MEK1 o MEK2 y en el que la fosforilación de MEK1 o MEK2 se determina usando un anticuerpo de MEK fosfo-específico o midiendo la fosforilación de proteína básica de mielina (MBP).

10. Un método para identificar un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer, que comprende:

- a) proporcionar una célula que comprende un polipéptido de BRAF mutante de la reivindicación 2;
- b) poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo; y
- c) determinar el efecto del compuesto en la fosforilación de un sustrato de BRAF o en la proliferación celular;

en el que la modulación negativa de la fosforilación del sustrato de BRAF o reducción de la proliferación celular en comparación con un control adecuado identifica el compuesto como un compuesto que es útil en el tratamiento del cáncer.

11. Un método de exploración basado en células para identificar un compuesto de ensayo como un inhibidor de BRAF de segunda generación, comprendiendo el método poner en contacto la célula hospedadora de la reivindicación 6 con un compuesto de ensayo, en el que la sensibilidad de la célula hospedadora al compuesto de

ensayo identifica el compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación.

12. El método de la reivindicación 11, en el que la sensibilidad de la célula hospedadora al compuesto de ensayo, se mide usando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en un ensayo de proliferación celular, un ensayo de viabilidad celular, y un ensayo de fosforilación de MEK, en el que una reducción en la proliferación celular, la viabilidad celular o la fosforilación de MEK en presencia del compuesto de ensayo, identifica el compuesto como un inhibidor de BRAF de segunda generación.

Figura 1: Secuencia de ácido nucleico de BRAF de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 1)

(Secuencia de referencia de NCBI: NM_004333.4; gi 187608632)

CGCCTCCCTTCCCCCTCCCCGCCCGACAGCGGCCGCTCGGGCCCCGGCTCTCGGTTATAAGAT
GGCGGCGCTGAGCGGTGGCGGTGGTGGCGGCGCGGAGCCGGGCCAGGCTCTGTTCAACGGG
GACATGGAGCCCAGGCCGCGCGCCGCGCGCCGCGCCGCTCTTCGGCTGCGGACCCTG
CCATTCCGGAGGAGGTGTGGAATATCAAACAAATGATTAAGTTGACACAGGAACATATAGAGGC
CCTATTGGACAAATTTGGTGGGGAGCATAATCCACCATCAATATATCTGGAGGCCTATGAAGAAT
ACACCAGCAAGCTAGATGCACTCCAACAAAGAGAACAACAGTTATTGGAATCTCTGGGGAACGG
AACTGATTTTTCTGTTTCTAGCTCTGCATCAATGGATACCGTTACATCTTCTTCTCTAGCCT
TTCAGTGCTACCTTCATCTCTTTTCAGTTTTTCAAATCCCACAGATGTGGCACGGAGCAACCCCA
AGTCACCACAAAAACCTATCGTTAGAGTCTTCTGCCCCAACAAACAGAGGACAGTGGTACCTGC
AAGGTGTGGAGTTACAGTCCGAGACAGTCTAAAGAAAGCACTGATGATGAGAGGTCTAATCCCA
GAGTGTGTGCTGTTTACAGAATTCAGGATGGAGAGAAGAAACCAATTGTTGGGACACTGATA
TTTTCTGGCTTACTGGAGAAGAATTGCATGTGGAAGTGTGGAGAATGTTCCACTTACAACACAC
AACTTTGTACGAAAAACGTTTTTTCACCTTAGCATTGTGACTTTTTGTCGAAAGCTGCTTTTTCCAG
GGTTTCCGCTGTCAAACATGTGGTTATAAATTTACCAGCGTTGTAGTACAGAAGTTCCACTGAT
GTGTGTTAATTATGACCAACTTGATTTGCTGTTTGTCTCCAAGTTCTTTGAACACCACCCAATACC
ACAGGAAGAGGCGTCTTAGCAGAGACTGCCCTAACATCTGGATCATCCCCTTCCGCACCCGC
CTCGGACTCTATTGGGCCCAATTCTCACCAGTCCGTCTCCTTCAAATCCATTCCAATTCCAC
AGCCCTTCCGACCAGCAGATGAAGATCATCGAAATCAATTTGGGCAACGAGACCGATCCTCATC
AGCTCCAATGTGCATATAAACACAATAGAACCTGTCAATATTGATGACTTGATTAGAGACCAAG
GATTCGTGGTGTGATGGAGGATCAACCACAGGTTTGTCTGCTACCCCCCTGCCTCATTACCTGG
CTACTAATAACGTGAAAGCCTTACAGAAATCTCCAGGACCTCAGCGAGAAAGGAAGTCATCTT
CATCCTCAGAAGACAGGAATCGAATGAAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGA
GATTCCTGATGGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATTGGATCTGGATCATTGGAACAGTCTACA
AGGGAAGTGGCATGGTGTGATGTGGCAGTGAAAATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCA
GTTACAAGCCTTCAAAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAAACACGACATGTGAATATCCTACTCT
TCATGGGCTATTCCACAAAGCCACAACCTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTT
GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACCAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCACGACA
GACTGCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
AATATAATTTCTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAATCT
CGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGCACCAGAAG
TCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATATGCATTTGGAATTTGTC
TGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCAAACATCAACAACAGGGACCAGATAATTTTTA
TGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGATCTCAGTAAGGTACGGAGTAACTGTCCAAAAGCCAT
GAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTCAAAAAGAAAAGAGATGAGAGACCACTCTTTCCCAAATTC
TCGCCTCTATTGAGCTGCTGGCCCCGCTCATTGCCAAAAATTCACCGCAGTGCATCAGAACCCTC
CTTGAATCGGGCTGGTTTCCAAACAGAGGATTTTAGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAACAC
CCATCCAGGCAGGGGGATATGGTGCCTTCTGTCCACTGAAACAAATGAGTGAGAGAGTTTCAG
GAGAGTAGCAACAAAAGGAAAATAAATGAACATATGTTTGTCTATATGTTAAATTGAATAAAATAC
TCTCTTTTTTTAAGGTGAACCAAAGAACAACCTTGTGTGGTTAAAGACTAGATATAATTTTTCCC
AACTAAAATTTATACTTAACATTGGATTTTTAACATCCAAGGGTTAAAATACATAGACATTGCTAA
AAATTGGCAGAGCCTCTTCTAGAGGCTTACTTTCTGTTCCGGGTTTGTATCATTCACTTGGTTAT
TTTAAGTAGTAACTTCAGTTTCTCATGCAACTTTGTTGCCAGCTATCACATGTCCACTAGGGAC
TCCAGAAGAAGACCCTACCTATGCCTGTGTTTGCAGGTGAGAAGTTGGCAGTCCGTTAGCCTGG
GTTAGATAAGGCAAACCTGAACAGATCTAATTTAGGAAGTCAGTAGAATTTAATAATTCTATTATTAT
TCTTAATAATTTTTCTATAACTATTTCTTTTTATAACAATTTGGAAAATGTGGATGTCTTTTATTTCC
TTGAAGCAATAAACTAAGTTTCTTTTTATAAAAA

**Figura 2: Secuencia polipeptídica de BRAF de *Homo sapiens*
(SEQ ID NO: 2)**

(Secuencia de referencia de NCBI: NP_004324.2; gi 33188459)

MAALSGGGGGGAEPGQALFNGDMEPEAGAGAGAAASSAADPAIPEEVWNIKQMIKLTQEHIALL
DKFGGEHNPPSIYLEAYEEYTSKLDALQQREQQLLES LGNGTDFSVSSSASMDTVTSSSSSSLSV
LPSSLSVFNPTDVARSNPKSPQKPIVRVFLPNKQRTVVPARCGVTVRDSLKKALMMRGLIPECC
AVYRIQDGEKKPIGWDTDISWLTGEELHVEVLENVPLTTHNFVRKTFFTLAFCDFCRKL LFQGFRC
QTCGYKFHQRCSTEVPLMVCVNYDQLDLLFVSKFFEHHPIPQEEASLAETALTS GSSPSAPASDSIG
PQILTSPSPSKSIPIQPFRPADEDHRNQFGQRDRSSSAPNVHINTIEPVNIDDLIRDQGF RDGGS
TTGLSATPPASLPGSLTNVKALQKSPGPQRERKSSSSSEDRNRMKTLGRRDSSDDWEIPDGOITV
GQRIGSGSFGTVYKKGKWHGDVAVKMLNVTAPTQQLQAFKNEVGVLKTRHVNILLFMGYSTKP
QLAIVTQWCEGSSLYHHLHIIETKFEMIKLIDIARQTAQGMDYLHAKSIIHRDLKSNNIFLHEDLTVKIG
DFGLATVKSRWSGSHQFEQLSGSILWMAPEVIRMQDKNPYSFQSDVYA FGI VLYELMTGQLPYSN
INNRDQIIFMVGRGYLSPDLSKVRSNCPKAMKRLMAECLKKRDERPLFPQILASIELLARSLPKIHR
SASEPSLNRAGFQTEDFSLYACASPKTPIQAGGYGAFPVH

Figura 3: Secuencia de ácido nucleico de BRAF V600E de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 3)

CGCCTCCCTTCCCCCTCCCGCCCGACAGCGGCCGCTCGGGCCCCGGCTCTCGGTTATAAGAT
GGCGGCGCTGAGCGGTGGCGGTGGTGGCGGCGCGGAGCCGGGCCAGGCTCTGTTCAACGGG
GACATGGAGCCCGAGGCCGCGCGCCGCGCGCGGCCCTCTTCGGCTGCGGACCCTG
CCATTCCGGAGGAGGTGTGGAATATCAAACAATGATTAAGTTGACACAGGAACATATAGAGGC
CCTATTGGACAAATTTGGTGGGGAGCATAATCCACCATCAATATATCTGGAGGCCTATGAAGAAT
ACACCAGCAAGCTAGATGCACTCCAACAAAGAGAACAACAGTTATTGGAATCTCTGGGGAACGG
AACTGATTTTTCTGTTTCTAGCTCTGCATCAATGGATACCGTTACATCTTCTTCTCTAGCCT
TTCAGTGCTACCTTCATCTCTTTTTCAGTTTTTCAAATCCCACAGATGTGGCACGGAGCAACCCCA
AGTCACCACAAAAACCTATCGTTAGAGTCTTCCGCCCCAACACAGAGGACAGTGGTACCTGC
AAGGTGTGGAGTTACAGTCCGAGACAGTCTAAAGAAAGCACTGATGATGAGAGGTCTAATCCCA
GAGTGCTGTGCTGTTTACAGAATTCAGGATGGAGAGAAGAAACCAATTGTTGGGACACTGATA
TTTCTGGCTTACTGGAGAAGAATTGCATGTGGAAGTGTGGAGAATGTTCCACTTACAACACAC
AACTTTGTACGAAAAACGTTTTTTCACCTTAGCATTGTTGTGACTTTTGTGAAAGCTGCTTTTTCCAG
GGTTTCCGCTGTCAAACATGTGGTTATAAATTTACCAGCGTTGTAGTACAGAAGTTCCACTGAT
GTGTGTTAATTATGACCAACTTGATTTGCTGTTTGTCTCCAAGTTCTTTGAACACCACCCAATACC
ACAGGAAGAGGCGTCTTAGCAGAGACTGCCCTAACATCTGGATCATCCCCTTCCGCACCCGC
CTCGGACTCTATTGGGCCCCAAATTCTACCAGTCCGTCTCCTTCAAATCCATTCCAATTCAC
AGCCCTTCCGACCAGCAGATGAAGATCATCGAAATCAATTTGGGCAACGAGACCGATCCTCATC
AGCTCCAATGTGCATATAAACACAATAGAACCTGTCAATATTGATGACTTGATTAGAGACCAAG
GATTTTCGTGGTATGGAGGATCAACCACAGGTTTGTCTGCTACCCCCCTGCCTCATTACCTGG
CTCACTAACTAACGTGAAAGCCTTACAGAAATCTCCAGGACCTCAGCGAGAAAGGAAGTCATCTT
CATCCTCAGAAGACAGGAATCGAATGAAAACACTTGGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGA
GATTCCTGATGGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAATTGGATCTGGATCATTGGAACAGTCTACA
AGGGAAGTGGCATGGTGTGTGGCAGTGAAAATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCA
GTTACAAGCCTTCAAAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAAACACGACATGTGAATATCCTACTCT
TCATGGGCTATTCCACAAAGCCACAACCTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTT
GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACCAAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATTGACAGACA
GACTGCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAAGTCAATCCACAGAGACCTCAAGGATTAAT
AATATATTTCTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCT
CGATGGAGTGGTCCCATCAGTTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGCACCAGAAG
TCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTTCAAGTCAAGATGTATATGCATTTGGAATTGTT
TGATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCAAACATCAACAACAGGGACCAGATAATTTTTA
TGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGATCTCAGTAAGGTACGGAGTAACTGTCCAAAAGCCAT
GAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTCAAAAAGAAAAGAGATGAGAGACCACTTTTCCCAAATTC
TCGCCTCTATTGAGCTGCTGGCCCGCTCATTGCCAAAATTCACCGCAGTGCATCAGAACCCCTC
CTTGAATCGGGCTGGTTTCCAAACAGAGGATTTTAGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAACAC
CCATCCAGGCAGGGGATATGGTGCCTTCTGTCCACTGAAACAAATGAGTGAGAGAGTTTCAG
GAGAGTAGCAACAAAAGGAAAATAAATGAACATATGTTTGTCTATATGTTAAATTGAATAAATAC
TCTTTTTTTTTAAGGTGAACCAAGAACAACCTTGTGTGGTTAAAGACTAGATATAATTTTTCCC
AACTAAAATTTATACTTAAACATTGGATTTTTAACATCCAAGGGTTAAAATACATAGACATTGCTAA
AAATTGGCAGAGCCTCTTCTAGAGGCTTTACTTTCTGTTCCGGGTTTGTATCATTCACTTGGTTAT
TTAAGTAGTAACTTCAGTTTCTCATGCAACTTTTGTGCCAGCTATCACATGTCCACTAGGGAC
TCCAGAAGAAGACCCTACCTATGCCTGTGTTTGCAGGTGAGAAGTTGGCAGTCCGTTAGCCTGG
GTTAGATAAGGCAAACCTGAACAGATCTAATTTAGGAAGTCAGTAGAATTTAATAATTCTATTATT
TCTTAATAATTTTCTATAACTATTTCTTTTTATAACAATTTGGAAAATGTGGATGTCTTTTATTTCC
TTGAAGCAATAAACTAAGTTTCTTTTTATAAAAA

Figura 4: Secuencia polipeptídica de BRAF V600E de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 4)

MAALSGGGGGGAEPGQALFNGDMEPEAGAGAGAAAASSAADPAIPEEVWNIKQMIKLTQEHIEALL
DKFGGEHNPPSIYLEAYEYTSKLDALQQREQQLLESLGNGTDFSVSSSASMDTVTSSSSSSLSV
LPSSLSVFNPTDVARSNPKSPQKPIVRVFLPNKQRTVVPARCGVTVRDSLKKALMMRGLIPECC
AVYRIQDGEKKPIGWDTDISWLTGEELHVEVLENVPLTTHNFVRKTFFTLAFCDFCRKLFFQGFRC
QTGKYKFHQRCSTEVPLMCVNYDQLDLLFVSKFFEHHPIPQEEASLAETALTSGSSPSAPASDSIG
PQILTSPSPSKSIPIQPFRPADEDHRNQFGQRDRSSSAPNVHINTIEPVNIDDLIRDQGFQGGGS
TTGLSATPPASLPGSLTNVKALQKSPGPQRERKSSSSSEDRNRMKTLGRRDSSDDWEIPDGOITV
GQRIGSGSFGTVYKKGKWHGDVAVKMLNVTAPTQQQLQAFKNEVGVLRKTRHVNILLFMGYSTKP
QLAIVTQWCEGSSLYHHLHIIETKFEMIKLIDIARQTAQGMDYLHAKSIIHRDLKSNIFLHEDLTVKIG
DFGLATKSRWSGSHQFEQLSGSILWMAPEVIRMQDKNPYSFQSDVYAFGIVLYELMTGQLPYSN
INNRDQIIFMVGRGYLSPDLSKVRSNCPKAMKRLMAECLKKKRDERPLFPQILASIELLARSLPKIHR
SASEPSLNRAFGQTEDFSLYACASPKTPIQAGGYGAFFVH

Figura 5: Paisaje mutacional de BRAF después de selección de RAF265

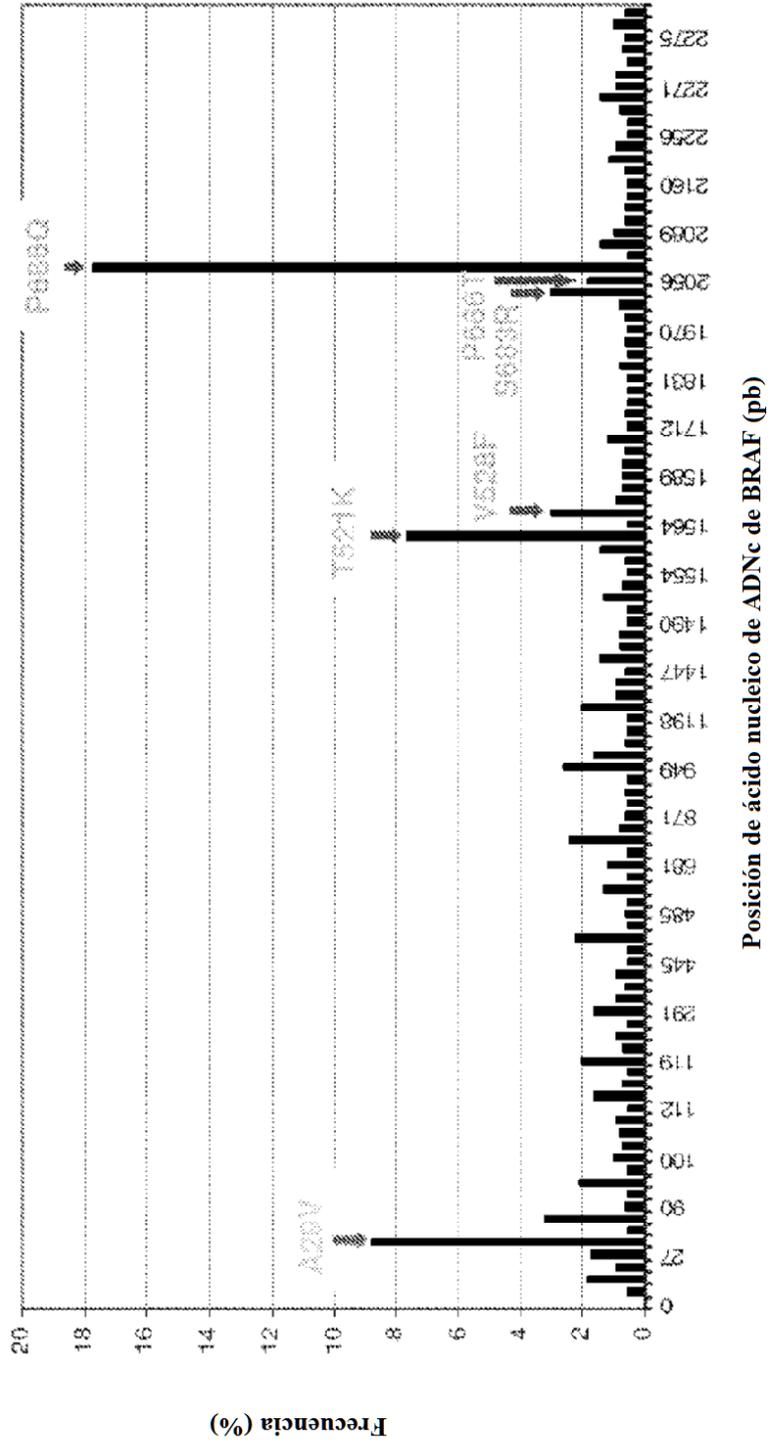
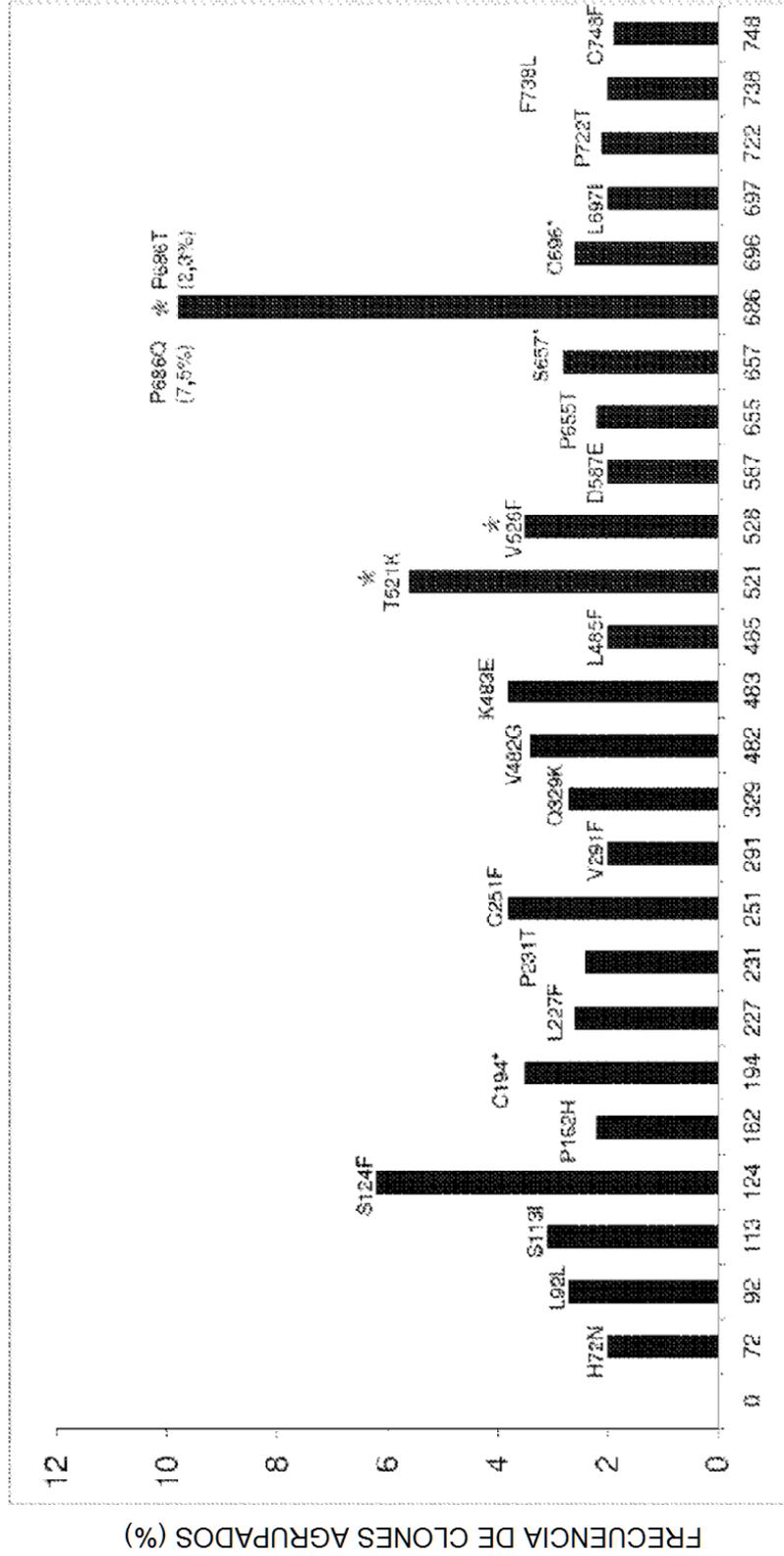


Figura 6: Paisaje mutacional de BRAF después de selección de PLX4720



POSICIÓN DE AMINOÁCIDO DE BRAF

* También identificado en exploración de RAF265

Figura 7: Mutaciones de BRAF común a exploración tanto de RAF265 como de PLX4720

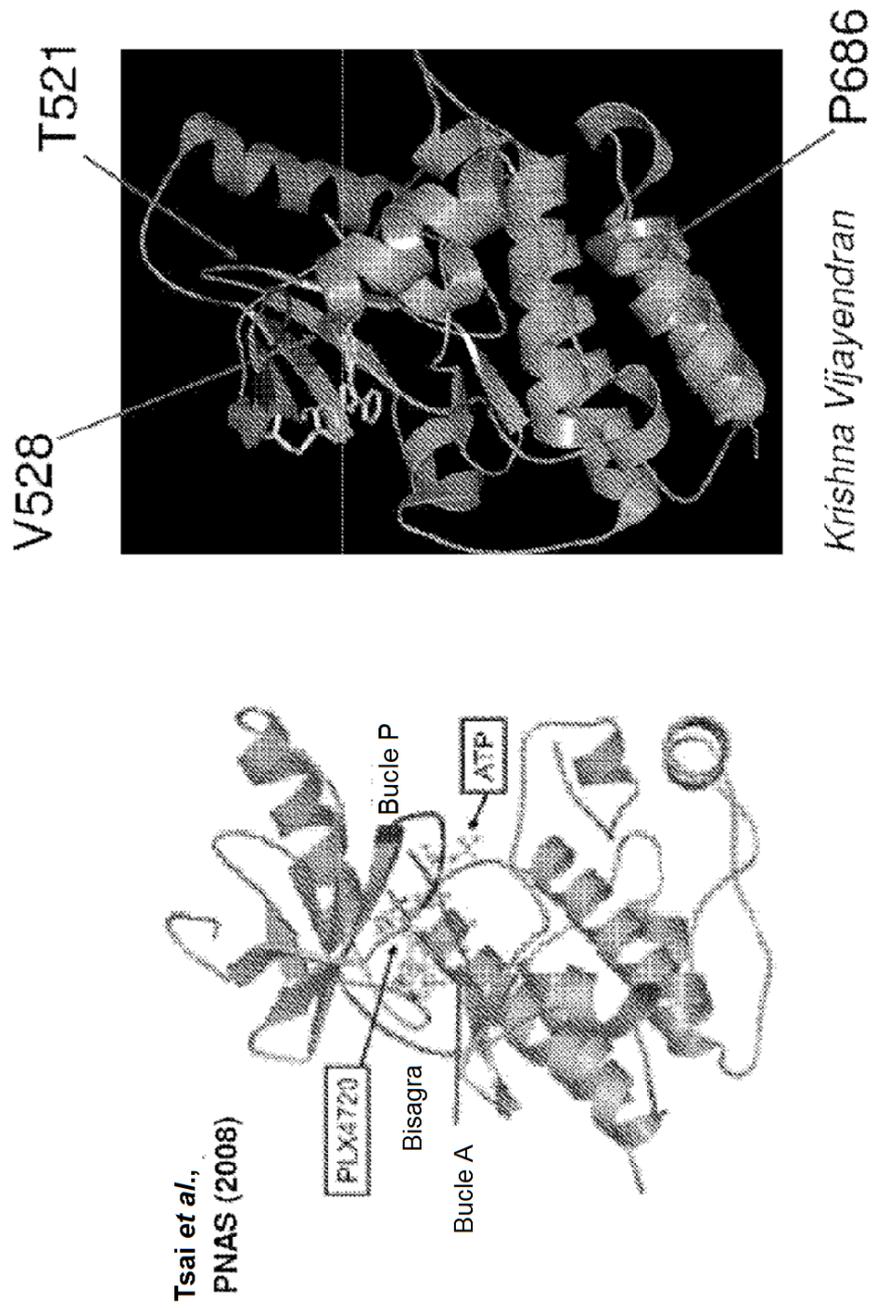


Figura 8: Estudios de inmunotransferencia de niveles de BRAF, p-MEK1/2 y p-ERK1/2 después de tratamiento con concentraciones crecientes de PLX4720

