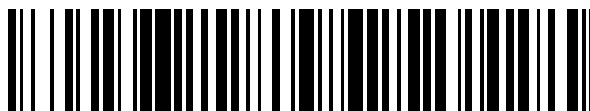


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 864**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/NL2014/050148**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14142660**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14714409 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2968564**

54 Título: **Combinaciones de inhibidores de MEK, EGFR y ERBB2 en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS**

30 Prioridad:
12.03.2013 NL 2010440

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2020

73 Titular/es:
**STICHTING HET NEDERLANDS KANKER
INSTITUUT- ANTONI VAN LEEUWENHOEK
ZIEKENHUIS (100.0%)
Plesmanlaan 121
1066 CX Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:
**SUN, CHONG y
BERNARDS, RENE**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 738 864 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

Combinaciones de inhibidores de MEK, EGFR y ERBB2 en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS

5

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a combinaciones farmacéuticas y composiciones útiles en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. La divulgación también se relaciona con el procedimiento de tratamiento de estos ciertos tipos de cánceres. En particular, la divulgación se refiere al uso combinado de inhibidores de MEK, EGFR y ERBB2 en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS y del cáncer de colon causado por un mutante de KRAS. La invención se refiere a la combinación de un inhibidor de MEK y un inhibidor dual de EGFR/ERBB2 para uso en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS, como se define en las reivindicaciones.

10

15

Estado de la técnica

El cáncer es una de las principales causas de muerte en Europa y los Estados Unidos. A pesar de los avances recientes en la comprensión de los mecanismos involucrados en el cáncer y en el diagnóstico y tratamiento, las terapias con medicamentos para la enfermedad metastásica a menudo son de naturaleza paliativa. Las terapias farmacológicas rara vez ofrecen una cura a largo plazo. Existe una necesidad constante de nuevos procedimientos de tratamiento, ya sea en forma de monoterapia o en forma de tratamiento de combinación, combinando diferentes medicamentos nuevos o conocidos como terapia de primera línea y como terapias de segunda línea en el tratamiento de tumores resistentes.

20

25

Las células cancerosas son heterogéneas por definición. Por ejemplo, múltiples mecanismos de mutación pueden conducir al desarrollo de cáncer y los mecanismos de mutación asociados con algunos tipos de cáncer pueden diferir entre un tipo de tejido y otro; por lo tanto, a menudo es difícil predecir si un cáncer específico responderá a un compuesto quimioterapéutico específico (Cancer Medicine, 5ª edición, Bast et al., B. C. Decker Inc., Hamilton, Ontario).

30

El tratamiento del cáncer está cambiando gradualmente de un enfoque centrado en el órgano a un enfoque centrado en la ruta. Las células cancerosas a menudo tienen una adicción a las señales que son generadas por los genes causantes de cáncer. En consecuencia, los medicamentos dirigidos contra el cáncer que inhiben selectivamente los productos de los oncogenes activados pueden tener efectos dramáticos en la viabilidad de las células cancerosas. Este enfoque ha producido resultados clínicos significativos para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) que tiene mutaciones activadoras en EGFR o translocaciones de la quinasa ALK y para pacientes con melanoma que tienen un tumor causado por un mutante de BRAF. Sin embargo, este enfoque no ha tenido éxito en todo tipo de cánceres, en particular en los cánceres caracterizados por mutaciones oncogénicas en uno de los miembros de la familia de genes RAS, en particular KRAS.

35

40

Por otra parte, se ha informado que mientras que los pacientes con melanoma con una mutación activadora específica en BRaf (V600E) se benefician del tratamiento con Vemurafenib, un inhibidor que fue diseñado específicamente contra esta forma mutante de BRaf, un subconjunto significativo de pacientes con carcinoma colorrectal que tienen el mismo mutante no responden al tratamiento con ese mismo medicamento. El motivo es que en las células de cáncer colorrectal está presente un mecanismo de retroalimentación a través del cual se puede sortear un bloqueo de señalización a nivel de BRaf. Este mecanismo de retroalimentación no está presente en las células de melanoma (Prahallad A, et al., Nature. 26 de enero de 2012; 483 (7387): 100-3). Esto sugiere que en el tratamiento del cáncer, la información de la ruta de un tipo de órgano no se puede transferir directamente a ningún otro órgano. H. C. Gong et al. divulga en Int. J. Proteomics, 2011, 1-13, la combinación de BIBW-2992 (afatinib) y el inhibidor de MEK PD-0325901 para uso en el tratamiento del NSCLC.

45

50

Un objetivo de la presente invención es proporcionar tratamientos nuevos y mejorados para el cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS, así como proporcionar productos y combinaciones terapéuticamente farmacéuticas para su uso en estos cánceres causados por mutantes de KRAS.

55

Descripción de los dibujos.

Figura 1. La supresión de ERBB3 por ARNhp mejora la respuesta al inhibidor de MEK. Las células H358 con mutante de KRAS (cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)) se infectaron con dos ARNhp independientes dirigidos a ERBB3 como se indica. El vector pLKO sirve como un vector de control. Después de la selección con puromicina, las células se cultivaron en ausencia o presencia de selumetinib 1 μ M durante 20 días.

60

Figura 2. Se cultivaron células de cáncer de pulmón H358 con una concentración creciente de selumetinib inhibidor de MEK solamente, gefitinib inhibidor de EGFR solamente, CP724714 inhibidor de ERBB2 solamente, afatinib

inhibidor dual de EGFR/ERBB2, dacomitinib inhibidor dual de EGFR/ERBB2 solamente o sus combinaciones como se indica. Las células se recogieron, se fijaron y se tiñeron después de 21 días.

Figura 3. Las células colorrectales SW837 se cultivaron en concentraciones crecientes de selumetinib inhibidor de MEK solamente, gefitinib inhibidor de EGFR solamente, CP724714 inhibidor de ERBB2 solamente, afatinib inhibidor dual de EGFR/ERBB2, dacomitinib inhibidor dual de EGFR/ERBB2 solamente o las combinaciones indicadas.

Descripción

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción.

Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, un procedimiento para administrar un medicamento incluye la administración de una pluralidad de moléculas (por ejemplo, 10, 100, 1000, 10 de miles, 100 de miles, millones o más moléculas).

Como se usa en este documento, el término "y/o" indica que uno o más de los casos declarados pueden ocurrir, solos o en combinación con al menos uno de los casos declarados, hasta con todos los casos declarados.

Como se usa en este documento, con "al menos" un valor particular significa ese valor particular o más. Por ejemplo, "al menos 2" se entiende que es lo mismo que "2 o más", es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ..., etc.

Como se usa en el presente documento "cáncer" y "canceroso", se refiere o describe la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, cáncer de colon y cáncer de pulmón. El cáncer también se conoce como neoplasia maligna.

Como se usa en el presente documento, "en combinación con" pretende referirse a todas las formas de administración que proporcionan un primer medicamento junto con un medicamento adicional (segundo, tercero). Los medicamentos pueden administrarse de forma simultánea, separada o secuencial y en cualquier orden. Los medicamentos administrados en combinación tienen actividad biológica en el sujeto al que se administran los medicamentos.

Como se usa en este documento, "cáncer de colon" o "cáncer colorrectal" se refiere a un cáncer de crecimiento celular descontrolado en el colon o el recto, o en el apéndice.

Como se usa en el presente documento, "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. También abarca el más limitante "consistir en".

Como se usa en el presente documento las "composiciones", "productos" o "combinaciones" útiles en los procedimientos de la presente divulgación incluyen aquellas adecuadas para diversas vías de administración, que incluyen, pero no se limitan a, aplicación intravenosa, subcutánea, intradérmica, subdérmica, intranodal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, oral, nasal, tópica (incluso bucal y sublingual), rectal, vaginal, en aerosol y/o parenteral o a través de mucosas. Las composiciones, formulaciones y productos de acuerdo con la invención de la divulgación normalmente comprenden los medicamentos (solos o en combinación) y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados.

Como se usa en el presente documento, "una cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un agente requerido para mejorar los síntomas de una enfermedad en relación con un paciente no tratado. La cantidad efectiva de agente o agentes activos utilizada para practicar la presente invención para el tratamiento terapéutico de un cáncer varía dependiendo de la forma de administración, la edad, el peso corporal y la salud general del sujeto. En última instancia, el médico o veterinario encargado decidirá la cantidad y el régimen de dosificación apropiados. Dicha cantidad se conoce como una cantidad "efectiva". Por lo tanto, en relación con la administración de un medicamento que, en el contexto de la divulgación actual, es "efectiva contra" una enfermedad o afección, indica que la administración de una manera clínicamente apropiada produce un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de pacientes, como una mejoría de los síntomas, una cura, una reducción de al menos un signo o síntoma de la enfermedad, una prolongación de la vida, una mejora de la calidad de vida u otro efecto generalmente reconocido como positivo por los médicos familiarizados con el tratamiento del tipo particular de enfermedad o condición.

Como se usa en el presente documento, "cáncer de pulmón" es un cáncer que representa casi un tercio de las muertes por cáncer, y se clasifica en general en dos tipos: cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de

pulmón de células pequeñas. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) comprende el 80-85% de los casos de cáncer de pulmón y los diferentes tipos de NSCLC se nombran según los tipos de células que se encuentran en el cáncer y cómo se ven las células bajo un microscopio. El NSCLC comprende carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, que comienza en varios tipos de células de pulmón grandes y adenocarcinoma, que comienza en las células que recubren los alvéolos del pulmón y producen sustancias como el moco. El cáncer de pulmón de células pequeñas es una forma de cáncer de pulmón altamente maligno que se compone de células ovoides pequeñas. En una realización de la invención, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas; en otra realización de la invención, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células pequeñas.

Descripción detallada

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones. La materia que no está abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención reivindicada. Cualquier referencia en la descripción a procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

La presente divulgación se basa en el sorprendente descubrimiento de que una combinación de inhibidores de las proteínas (enzimas) MEK, EGFR y ERBB2 es altamente sinérgica para inhibir la proliferación o inducir apoptosis en cánceres causados por mutación de KRAS, en particular células con cáncer de pulmón causado por mutante de KRAS y en células de cancer de colon causado por mutante de KRAS. Además, la combinación reivindicada funciona particularmente bien en aquellas células que son relativamente insensibles a la inhibición por los inhibidores de MEK solamente.

Los inventores de la presente invención han demostrado a través de experimentos que la combinación de un inhibidor de MEK, un inhibidor de EGFR y un inhibidor de ERBB2 manifiesta un efecto terapéutico sinérgico, inesperado y fuerte en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS y cáncer de colon causado por mutante de KRAS. Con base en datos experimentales, los presentes inventores creen (sin estar limitados por la teoría) que específicamente en el cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS y el cáncer de colon causado por un mutante de KRAS, la inhibición de MEK conduce a la formación dependiente de MYC de complejos heterodiméricos EGFR-ERBB3 y ERBB2-ERBB3 activados por quinasa que pueden inhibirse para permitir que las células de cáncer de colon o de cáncer de pulmón respondan a la inhibición de MEK.

La combinación reivindicada en el presente documento presenta una sinergia terapéutica. La sinergia terapéutica se puede demostrar mostrando que la combinación es superior a uno u otro de los constituyentes utilizados en su dosis óptima.

En un primer aspecto de la divulgación, se proporciona un inhibidor de MEK para uso en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS o cáncer de colon causado por un mutante de KRAS, en el que el inhibidor de MEK se administra simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de EGFR y simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de ERBB2. En tal realización, el inhibidor de MEK es para uso en el tratamiento de pacientes, a los cuales, durante el tratamiento, también se proporciona un inhibidor de EGFR y un inhibidor de ERBB2, opcionalmente en el que el inhibidor es tanto un inhibidor de EGFR como un inhibidor ERBB2. El experto en la materia entenderá que cualquiera de, el inhibidores de MEK, el inhibidor de ERGF y el inhibidor de ERBB2 pueden administrarse al paciente de forma simultánea, separada o secuencialmente de los otros medicamentos.

El inhibidor de MEK puede administrarse a los pacientes ya sea de forma simultánea, separada o secuencial con el otro u otros medicamentos. Por ejemplo, en la práctica, el folleto del producto del inhibidor de MEK puede sugerir el uso simultáneo, separado o secuencial del inhibidor de MEK con el inhibidor de EGFR y el uso simultáneo, separado o secuencial con el inhibidor de ERBB2, o simultánea, separada o secuencialmente el inhibidor de EGFR y de ERBB2.

En un segundo aspecto, se proporciona un inhibidor de EGFR para uso en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS o cáncer de colon causado por un mutante de KRAS, en el que el inhibidor de EGFR se administra simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de ERBB2 y simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de MEK.

El inhibidor de EGFR puede administrarse a los pacientes simultánea, separada o secuencialmente con el otro u otros medicamentos. Por ejemplo, en la práctica, el folleto del producto del inhibidor de EGFR puede sugerir el uso simultáneo, separado o secuencial del inhibidor de EGFR con el inhibidor de MEK y el uso simultáneo, separado o secuencial con el inhibidor de ERBB3, o el inhibidor de MEK y de ERBB2.

En un tercer aspecto, se proporciona un inhibidor de ERBB2 para uso en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS o cáncer de colon causado por un mutante de KRAS, en el que el inhibidor de

ERBB2 se administra simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de EGFR y simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de MEK.

5 El inhibidor de ERBB2 se puede administrar a los pacientes simultánea, separada o secuencialmente con el otro u otros medicamentos. Por ejemplo, en la práctica, el folleto del producto del inhibidor de ERBB2 puede sugerir el uso simultáneo, separado o secuencial del inhibidor de ERBB2 con el inhibidor de EGFR y el uso simultáneo, separado o secuencial con el inhibidor de MEK, o el inhibidor de EGFR y de MEK.

10 Como se explicó anteriormente, el nuevo uso del inhibidor de MEK, o el inhibidor de EGFR o el inhibidor de ERBB2 no se limita a combinaciones administradas por separado, sino que también incluye las composiciones obtenidas por asociación física de los medicamentos y en cualquier caso se puede obtener un efecto sinérgico.

15 Como se usa en este documento, la administración "simultánea" se refiere a la administración de más de un medicamento al mismo tiempo, pero no necesariamente a través de la misma vía de administración o en forma de una formulación combinada. Por ejemplo, un medicamento puede proporcionarse por vía oral, mientras que el otro puede administrarse por vía intravenosa durante la visita de un paciente a un hospital. Separado incluye la administración de los medicamentos en forma separada y/o en momentos separados en el tiempo, pero nuevamente, no necesariamente a través de la misma vía de administración. Secuencialmente indica que la administración de un primer medicamento es seguida, inmediatamente en el tiempo, por la administración del segundo medicamento.

25 La combinación de medicamentos descritos en el presente documento se administrará preferiblemente al paciente en una forma que sea adecuada para la administración al paciente y en una dosis que sea eficaz, por ejemplo, en el tratamiento con los inhibidores de MEK, EGFR y ERBB2. .

30 La presente divulgación se relaciona así, en estos aspectos, con una terapia de combinación, en la que durante la terapia el paciente se trata con medicamentos que son inhibidores de MEK, EGFR y ERBB2. El experto en la materia entenderá que el tratamiento puede comprender el uso de medicamentos que, por sí solos, pueden inhibir MEK, EGFR y ERBB2, o medicamentos que inhiben uno o dos de MEK, EGFR y ERBB2. En realizaciones preferidas descritas en toda la solicitud, el medicamento que inhibe EGFR y el medicamento que inhibe ERBB2 es el mismo, es decir, tiene la misma fracción activa, por ejemplo, afatinib o dacomitinib. En otras palabras, dicho medicamento puede ser un inhibidor de pan-ERBB, que inhibe más de un ERBB al mismo tiempo, por ejemplo, inhibiendo las tirosina quinasas tanto de ERBB1 (EGFR), ERBB2 (HER2) como de ERBB4. Otros ejemplos son los inhibidores duales de ERBB, por ejemplo, que inhiben ERBB1 (EGFR) y ERBB2 (HER2).

35 La terapia es adecuada para su uso en pacientes con cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS, en particular NSCLC, o un cáncer de colon causado por un mutante de KRAS. El término "cáncer causado por mutante de KRAS", y por lo tanto cáncer de pulmón causado por mutante de KRAS o cáncer de colon causado por mutante de KRAS, es bien conocido por los expertos. Una visión general de las mutaciones de RAS en el cáncer fue reportada por Prior et al (2012) Cancer Res; 2457-67. Las células con mutante de KRAS promueven la oncogénesis debido a que se activan mutacionalmente, en la mayoría de los casos, en los codones 12, 13 y 61. En total, se han caracterizado cuarenta y cuatro mutaciones puntuales separadas en isoformas de RAS, con 99,2% en los codones 12, 13 y 61.

45 La GTPasa KRas, también conocida como homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2 o KRAS, es una proteína que en humanos está codificada por el gen KRAS. KRAS actúa como un interruptor de encendido/apagado molecular. Una vez que se enciende, recluta y activa las proteínas necesarias para la propagación del factor de crecimiento y la señal de otros receptores, tal como la c-Raf y PI 3-quinasa.

50 El producto proteico del gen KRAS normal desempeña una función esencial en la señalización del tejido normal, y la mutación de un gen KRAS es un paso esencial en el desarrollo de muchos cánceres. Al igual que otros miembros de la familia Ras, la proteína KRAS es una GTPasa y es un jugador temprano en muchas vías de transducción de señales.

55 MEK comprende tanto MEK1 como MEK2: MAP/ERK quinasa 1, MEK1, PRKMK1, MAPKK1, MAP2K1, MKK1 son la misma enzima, conocida como MEK1, MAP/ERK quinasa 2, MEK2, PRKMK2, MAPKK2, MAP2K2, MKK2 son la misma enzima, conocida como MEK2. MEK1 y MEK2, junto con MEK, pueden fosforilar los residuos de serina, treonina y tirosina en sustratos de proteínas o péptidos. Hasta la fecha, se han identificado pocos sustratos celulares de isoformas de MEK.

60 Los procedimientos para determinar los inhibidores de MEK (inhibidores de MEK1, MEK2 o ambas) son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en detalle en el documento EP2496575.

65 Los ejemplos de medicamentos que inhiben MEK incluyen sorafenib, PD-0325901 (Pfizer), AZD-8330 (AstraZeneca), RG-7167 (Roche/Chugai), RG-7304 (Roche), CIP-137401 (Cheminpharma), WX-554 (Wilex; UCB), SF-2626 (Semaphore Pharmaceuticals Inc), RO-5068760 (F Hoffmann-La Roche AG), RO-4920506 (Roche), G-573

(Genentech) y G-894 (Genentech), profármaco N-acil sulfonamida GSK-2091976A (GlaxoSmithKline), BI-847325 (Boehringer Ingelheim), WYE-130600 (Wyeth/Pfizer), ERK1-624, ERK1-2067, ERK1-23211, AD-GL0001 (ActinoDrug Pharmaceuticals GmbH) selumetinib (AZD6244), trametinib, TAK-733, Honokiol, MEK-162, derivados y sales de los mismos. Uno o más de los inhibidores de MEK anteriores pueden usarse preferentemente en las composiciones, combinaciones, productos y procedimientos de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo sorafenib, PD-0325901, AZD-8330, RG-7167, RG-7304, CIP-137401, WX-554, SF-2626, RO-5068760, RO-4920506, G-573 y G-894, profármaco de N-acil-sulfonamida, GSK-2091976^a, BI-847325, WYE-130600, ERK1-624, ERK1-2067, ERK1-23211, AD-GL0001, selumetinib (AZD6244), trametinib, TAK-733, Honokiol, MEK-162, o derivados o sales de los mismos.

De acuerdo con la invención, el inhibidor de MEK es selumetinib o trametinib.

El EGFR, o receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro de la familia de tirosina quinasas tipo 1 de receptores del factor de crecimiento. EGFR juega un papel crítico en el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia. La activación de estos receptores ocurre típicamente a través de la unión específica de ligandos, lo que resulta en hetero u homodimerización entre los miembros de la familia del receptor, con la subsiguiente autofosforilación del dominio tirosina quinasa. Esta activación desencadena una cascada de vías de señalización intracelular involucradas tanto en la proliferación celular como en la supervivencia. Los miembros de esta familia, incluidos EGFR y HER2, han sido implicados directamente en la transformación celular.

Los procedimientos para determinar los inhibidores de EGFR son conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en detalle en el documento EP1877398.

Los ejemplos de medicamentos que inhiben el EGFR incluyen Tarceva^{MR} (también conocido como erlotinib; OSI-774). Es un inhibidor selectivo de la tirosina quinasa EGFR. Erlotinib inhibe la tirosina quinasa EGFR humana con una CI₅₀ de 2 nM (0,786 mg/mL) en un ensayo enzimático *in vitro*. Otros ejemplos de inhibidores de EGFR incluyen erlotinib, panitumumab (Abgenix), vandetanib (AstraZeneca), icotinib (clorhidrato; Beta Pharma), CO-1686 (Avila Therapeutics), AZD-4769, poziotinib (Hanmi Pharmaceutical Co Ltd), CUDC-101 (Curis), Exelixis, S-222611 (Shioogi), AC-480 (Ambit), imgatuzumab (Glycart Biotechnology AG), sapitinib, TAS-2913 (Taiho Pharmaceutical Co Ltd), theliatinib (Hutchison Medipharma Enterprises Ltd), XGFR-2421 (Glycart), HM-61713B (Hanmi Pharmaceutical Co Ltd), epitinib (Hutchison Medipharma Enterprises Ltd), NRC-2694 (Natco), MLBS-42 (ProQinase GmbH), JRP-890 (Prous Institute For Biomedical Research Sa), cetuximab, AL-6802 (Advenchen Laboratories LLC), TAK-285 (Takeda), BGB-102 (Johnson & Johnson), AEE-788 (Novartis), gefitinib, DMS-3008 (Domantis Ltd), TX-2036 (Universidad de Tokushima), KI-6783, KI-6896 (Kirin Brewery Co Ltd), derivados y sales de los mismos. Uno o más de los inhibidores de EGFR anteriores se pueden usar preferiblemente en las composiciones, combinaciones, productos y procedimientos de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, erlotinib, panitumumab (Abgenix), vandetanib (AstraZeneca), icotinib (clorhidrato; Beta Pharma), CO-1686 (Avila Therapeutics), AZD-4769, poziotinib (Hanmi Pharmaceutical Co Ltd), CUDC-101 (Curis), Exelixis, S-222611 (Shioogi), AC-480 (Ambit), imgatuzumab (Glycart) Biotechnology AG), sapitinib, TAS-2913 (Taiho Pharmaceutical Co Ltd), theliatinib (Hutchison Medipharma Enterprises Ltd), XGFR-2421 (Glycart), HM-61713B (Hanmi Pharmaceutical Co Ltd), epitinib (Hutchison Medipharma Enterprises Ltd), NRC -2694 (Natco), MLBS-42 (ProQinase GmbH), JRP-890 (Prous Institute For Biomedical Research Sa), cetuximab, AL-6802 (Advenchen Laboratories LLC), TAK-285 (Takeda), BGB-102 (Johnson & Johnson), AEE-788 (Novartis), gefitinib, DMS-3008 (Domantis Ltd), TX-2036 (Universidad de Tokushima), KI-6783, KI-6896 (Kirin Brewery Co Ltd), afatinib, dacometinib, derivados o sales de los mismos. De acuerdo con la invención, el inhibidor de EGFR es afatinib o dacomitinib.

ERBB2 es un receptor de tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores ErbB, que comprende cuatro miembros estrechamente relacionados: receptor de EGF (EGFR), ErbB2/Neu/HER2, ErbB3 y ErbB4. Los receptores de ErbB se expresan en una variedad de tejidos de origen epitelial, mesenquimal y neuronal, en los que desempeñan funciones fundamentales en el desarrollo, proliferación, diferenciación y angiogénesis. Estos receptores son activados por numerosos ligandos específicos de ErbB que se unen a los dominios extracelulares y conducen a la formación de homo y heterodímeros.

Los procedimientos para determinar los inhibidores de ERBB2 son conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en detalle en el documento EP1877398.

Los ejemplos de medicamentos que inhiben ERBB2 incluyen los anticuerpos Herceptin, pertuzumab, trastuzumab, dacomitinib, (ERBB2) como se describe en el documento WO-2012162561, neratinib, tosilato de alitinib, poziotinib, CUDC-101 (Curis), BT-2111 (biOsasis) margetuximab, Exelixis, NT-004 o NT-113 (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co Ltd), S-222611 (Shionogi & Co Ltd), AG879, Mubritinib, AC-480 (Bristol-Myers Squibb Co), sapitinib, MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals Inc), PR-610 (Universidad de Auckland), cipatinib trastuzumab-duocarmycin, Prolanta, varlitinib, kahalalide F, TrasGEX, masoprocol, ARRY-380 (Array BioPharma), erbinumab, HuMax-Her2, CP-7714 (CP), COVA-208 (Covagen), lapatinib y pazopanib, AEE-788 (Novartis), canertinib, pelitinib, BMS-690514 (Bristol-Meyers Squibb), afatinib, dacometinib, derivados y sales de los mismos. Uno o más de los inhibidores de EGFR anteriores pueden usarse preferiblemente en las composiciones, combinaciones, productos y procedimientos de acuerdo con la presente invención, por ejemplo pertuzumab, trastuzumab, dacomitinib, anticuerpos como se

describe en el documento WO-2012162561, neratinib, tosilato de allitinib, poziotinib, CUDC-101 (Curis), BT-2111 (biOsasis), margetuximab, Exelixis, NT-004 o NT-113 (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co Ltd), S-222611 (Shionogi & Co Ltd), AG879, Mubritinib, AC-480 (Bristol-Myers Squibb Co), sapitinib, MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals Inc), PR-610 (Universidad de Auckland), cipatinib trastuzumab-duocarmycin, Prolanta, varlitinib, kahalalide F, TrasGEX, masoprocol, ARRY-380 (Array-380) BioPharma), erbicinumab, HuMax-Her2, CP-724714 (Pfizer), COVA-208 (Covagen), lapatinib y pazopanib, AEE-788 (Novartis), canertinib, pelitinib, BMS-690514 (Bristol-Meyers Squibb), afatinib, dacometinib, derivados y sales de los mismos.

De acuerdo con la invención, el inhibidor de ERBB2 es afatinib o dacomitinib.

En una realización preferida de los aspectos anteriores, el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor. En esta realización, el tratamiento puede comprender, por lo tanto, el uso de un inhibidor de MEK en combinación con el denominado inhibidor dual tanto de EGFR como de ERBB2. Los procedimientos para determinar inhibidores duales pertenecen al conocimiento del experto en la materia y, por ejemplo, como se describe en el documento EP1877398. Los ejemplos preferidos de dicho medicamento incluyen afatinib o dacometinib.

En otra realización preferida, el inhibidor de MEK se selecciona del grupo que consiste en sorafenib, PD-0325901 (Pfizer), AZD-8330 (AstraZeneca), RG-7167 (Roche/Chugai), RG-7304 (Roche), CIP-137401 (Cheminpharma), WX-554 (Wilex; UCB), SF-2626 (Semafore Pharmaceuticals Inc), RO-5068760 (F Hoffmann-La Roche AG), RO-4920506 (Roche), G-573 (Genentech) y G-894 (Genentech), profármaco N-acil sulfonamida GSK-2091976A (GlaxoSmithKline), BI-847325 (Boehringer Ingelheim), WYE-130600 (Wyeth/Pfizer), ERK1-624, ERK1-2067, ERK1-267, AD-GL0001 (ActinoDrug Pharmaceuticals GmbH), selumetinib (AZD6244), trametinib, TAK-733, Honokiol, MEK-162, derivados y sales de los mismos.

En otra realización preferida, el inhibidor de EGFR se selecciona del grupo que consiste en erlotinib, panitumumab (Abgenix), vandetanib (AstraZeneca), icotinib (clorhidrato; Beta Pharma), CO-1686 (Avila Therapeutics), AZD-4769, poziotinib (Hanmi Pharmaceutical Co Ltd), CUDC-101 (Curis), Exelixis, S-222611 (Shioogi), AC-480 (Ambit), imgatuzumab (Glycart Biotechnology AG), sapitinib, TAS-2913 (Taiho Pharmaceutical Co Ltd), theliatinib (Hutchison Medipharma Enterprises Ltd), XGFR-2421 (Glycart), HM-61713B (Hanmi Pharmaceutical Co Ltd), epitinib (Hutchison Medipharma Enterprises Ltd), NRC-2694 (Natco), MLBS-42 (ProQinase GmbH), JRP -890 (Prous Institute For Biomedical Research Sa), cetuximab, AL-6802 (Advenchen Laboratories LLC), TAK-285 (Takeda), BGB-102 (Johnson & Johnson), AEE-788 (Novartis), gefitinib, DMS-3008 (Domantis Ltd), TX-2036 (Universidad de Tokushima), KI-6783, KI-6896 (Kirin Brewery Co Ltd), afatinib, dacometinib y derivados y sus sales.

En otra realización preferida, el inhibidor de ERBB2 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de pertuzumab, trastuzumab, dacomitinib, (ERBB2) como se describe en el documento WO-2012162561, neratinib, tosilato de alitinib, poziotinib, CUDC-101 (Curis), BT-2111 (biOsasis), margetuximab, Exelixis, NT-004 o NT-113 (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co Ltd), S-222611 (Shionogi & Co Ltd), AG879, Mubritinib, AC-480 (Bristol-Myers Squibb Co), sapitinib, MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals Inc), PR-610 (Universidad de Auckland), cipatinib trastuzumab-duocarmycin, Prolanta, varlitinib, kahalalide F, TrasGEX, masoprocol, ARRY-380 (Array BioPharma), erbicinumab, HuMax-Her, CP-724714 (Pfizer), COVA-208 (Covagen), lapatinib y pazopanib, AEE-788 (Novartis), canertinib, pelitinib, BMS-690514 (Bristol-Meyers Squibb), afatinib, dacometinib, derivados y sales de los mismos.

En otra realización preferida, el inhibidor de MEK es selumetinib o PD-0325901 (N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-benzamida), y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 es afatinib o dacometinib. Más preferiblemente, el inhibidor de MEK es PD-0325901, y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 es dacometinib.

De acuerdo con la invención, el inhibidor de MEK es selumetinib, y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 es dacomitinib o afatinib, o el inhibidor de MEK es trametinib, y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 es afatinib.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un producto que comprende un inhibidor de MEK, un inhibidor de EGFR y un inhibidor de ERBB2 como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS o cáncer de colon causado por mutante de KRAS. Como se observa en los ejemplos a continuación, la combinación de dicho inhibidor de MEK, inhibidor de EGFR o inhibidor de ERBB2 sorprendentemente inhibe de manera sinérgica la proliferación y/o induce la apoptosis de células de cáncer de colon causado por mutante de KRAS o células de cáncer de pulmón causado por mutante de KRAS.

Como se detalló anteriormente, el producto es para uso simultáneo, separado o secuencial y puede comprender la misma combinación de inhibidor de MEK, inhibidor de EGFR y/o inhibidor de ERBB2 como se describe en los párrafos anteriores.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un producto farmacéutico terapéutico que comprende un inhibidor de MEK, un inhibidor de EGFR y un inhibidor de ERBB2. Preferiblemente, la preparación

combinada es para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS o cáncer de colon causado por un mutante de KRAS, como se detalla en este documento. Como se detalló anteriormente, también la combinación puede comprender la misma combinación de inhibidor de MEK, inhibidor de EGFR y/o inhibidor de ERBB2 como se describe en los párrafos anteriores.

En otro aspecto se proporciona el uso de un inhibidor de MEK, un inhibidor de EGFR y/o un inhibidor de ERBB2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS o cáncer de colon causado por un mutante de KRAS, en el que el tratamiento comprende la administración simultánea, separada o secuencial de un inhibidor de MEK, un inhibidor de EGFR y un inhibidor de ERBB2. Como se detalló anteriormente, también la combinación puede comprender la misma combinación de inhibidor de MEK, inhibidor de EGFR y/o inhibidor de ERBB2 como se describe en los párrafos anteriores.

En un último aspecto, se proporciona un procedimiento para el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS o cáncer de colon causado por un mutante de KRAS, en el que el procedimiento comprende la administración simultánea, separada o secuencial, en un paciente que lo necesite, de un Inhibidor de MEK, un inhibidor de EGFR y un inhibidor de ERBB2. Como se detalló anteriormente, también la combinación puede comprender la misma combinación de inhibidor de MEK, inhibidor de EGFR y/o inhibidor de ERBB2 como se describe en los párrafos anteriores.

El tratamiento del paciente incluye el tratamiento en la primera línea o la segunda línea, o la tercera línea. En particular, la divulgación en el presente documento puede usarse ventajosamente en pacientes que, por ejemplo, en monoterapia, muestran una respuesta reducida al uso de un inhibidor de MEK, ya sea desde el principio o después de un cierto período de tratamiento con el inhibidor de MEK, por ejemplo, los pacientes que son resistentes al inhibidor de MEK.

En una realización preferida, el cáncer causado por un mutante de KRAS se caracteriza por la expresión o expresión aumentada de ERBB3 (o HER3), un receptor tirosina-proteína quinasa codificado por el gen *ERBB3*.

Las realizaciones descritas deben considerarse en todos los aspectos como ilustrativas solamente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Introducción

Procedimientos experimentales

Detección de ARNhp letalmente sintético

Se ensambló una biblioteca de ARNhp centrada en el kinoma dirigida a 535 quinasas humanas y genes relacionados con la quinasa a partir de la colección de ARNhp de todo el genoma humano The RNAi Consortium (TRC) (TRC-Hs1.0). La biblioteca de ARNhp kinoma se introdujo en células de pulmón H358 por transducción lentiviral. Las células que expresaban establemente el ARNhp se cultivaron en presencia o ausencia de selumetinib. La abundancia de cada ARNhp en las muestras reunidas se determina mediante la secuenciación profunda de Illumina. Los ARNhp priorizados para análisis posteriores se seleccionaron por las veces en que se agotó la muestra tratada con selumetinib (un inhibidor de MEK) comparada con aquella en la muestra sin tratar. Más detalles se describen en (Prahallad et al., 2012).

Experimentos de xenoinjerto tumoral

Todos los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo con las directrices italianas y europeas para la experimentación con animales. Las células (5 millones/ratón) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratones desnudos hembra de 7 semanas de edad y se cultivaron como xenoinjertos tumorales. El volumen del tumor con base en las mediciones del calibre se calculó mediante la fórmula elipsoidal modificada (volumen del tumor = $1/2$ (longitud x ancho²)). El tratamiento con afatinib (un inhibidor dual de ERBB2/EGFR, 12,5 mg/kg), trametinib (un inhibidor de MEK, 1 mg/kg) o su combinación (en la misma dosis que la monoterapia) se inició cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 250-300 mm³.

Muestras de pacientes con NSCLC causada por mutante de KRAS

El comité de ética médica de VUMC otorgó el permiso para tomar biopsias de un paciente con NSCLC causado por un mutante de KRAS antes y después del tratamiento con trametinib durante 7 días.

Resultados

Líneas celulares de cáncer de pulmón causado por mutante de KRAS y de colon causado por mutante de KRAS no responden a los inhibidores de MEK

Para estudiar cómo las células de cáncer causado por mutante de KRAS responden *in vitro* a la inhibición de MEK, se determinó la eficacia del inhibidor de MEK selumetinib (AZD6244) en 4 líneas celulares de NSCLC (pulmón) y 4 de cáncer de colon mediante un ensayo de proliferación a largo plazo. Los datos muestran que todas las líneas celulares de cáncer de colon, excepto una, fueron relativamente insensibles al selumetinib. Consistente con esto, de las líneas celulares de cáncer causado por mutante de KRAS presentes en las enciclopedias de líneas celulares de Sanger y CCLE (Barretina et al., 2012; Garnett et al., 2012), la gran mayoría tiene un CI50 para selumetinib de más de 1 μ M. Juntos, estos datos de líneas celulares recapitulan los estudios preclínicos en animales y los datos de ensayos clínicos de fase temprana que muestran solo una actividad modesta de la inhibición de MEK en tumores causados por mutante de KRAS (Adjei et al., 2008; Janne et al., 2013; Migliardi et al., 2012).

Una detección letal sintético con inhibidor de MEK.

Recientemente, se ha descrito el uso de un enfoque de detección letal sintética centrada en el kinoma, que permite la identificación de quinasas cuya inhibición es fuertemente sinérgica con un medicamento contra el cáncer de interés (Prahallad et al., 2012). En resumen, en dicha detección genética, se introduce una colección de 3530 vectores de ARNhp que se dirigen colectivamente a todas las 518 quinasas humanas para la supresión a través de la interferencia de ARN en las células cancerosas a través de una infección lentiviral. Cada uno de estos vectores de inactivación tiene un identificador de código de barras molecular basado en ADN único, que permite la cuantificación de la abundancia relativa de cada uno de los vectores de ARNhp en presencia y ausencia del medicamento (Prahallad et al., 2012). Para encontrar quinasas cuya supresión es sinérgica con el inhibidor de MEK selumetinib en NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), causado por mutante de KRAS, se infectaron células de pulmón H358 resistentes a selumetinib con la biblioteca de ARNhp de kinoma y se células cultivadas tanto en presencia como en ausencia de selumetinib. Después de 21 días, se aisló ADN genómico de ambas células de las poblaciones tratadas y no tratadas y los códigos de barras contenidos en los casetes de ARNhp se recuperaron mediante PCR y su abundancia se determinó mediante secuenciación profunda. Para la selección de resultados, solo se incluyeron los ARNhp para los cuales las frecuencias de lectura media total fueron superiores a 1.000. Para minimizar la posibilidad de identificar los efectos fuera del objetivo, los aciertos se seleccionaron en función de la presencia de al menos dos ARNhp individuales dirigidos al mismo gen en la lista superior. Dos vectores de ARNhp independientes dirigidos a la quinasa ERBB3 relacionada con EGFR estaban entre los principales vectores de ARNhp agotados en esta lista. Para validar este hallazgo, se infectaron células de pulmón H358 con estos dos vectores de ARNhp ERBB3 (que redujeron los niveles de ERBB3) y se cultivaron estas células con o sin el inhibidor de MEK selumetinib durante 21 días. La inhibición de ERBB3 no afectó significativamente la proliferación de células de pulmón H358, pero la supresión de ERBB3 en combinación con el inhibidor de MEK selumetinib causó una inhibición marcada de la proliferación en células de pulmón H358 (Figura 1). Se obtuvieron resultados similares en células de cáncer de colon SW480 y células de pulmón de NSCLC H2030 causados por mutante de KRAS.

Los inhibidores duales de EGFR/ERBB2 hacen sinergia con los inhibidores de MEK

El ERBB3 es el único miembro defectuoso de la quinasa de la familia de genes RTK de ERBB que consta de cuatro miembros: ERBB1-4. Sin embargo, ERBB3 puede formar complejos heterodiméricos de quinasa activa con otros miembros de la familia de ERBB que albergan actividad de tirosina quinasa (Sithanandam y Anderson, 2008). Se encontró que el tratamiento con selumetinib inhibidor de MEK de células de pulmón H358 causó un aumento marcado tanto en la proteína ERBB3 como en la proteína ERBB2. Se obtuvieron resultados similares en células de cáncer de colon SW837 y células de pulmón de NSCLC H2030, lo que sugiere que esto es una respuesta común a la inhibición de MEK en el cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS y cáncer de colon causado por un mutante de KRAS. Esto dio lugar a un aumento en los complejos heterodiméricos EGFR-ERBB3 y ERBB2-ERBB3, de acuerdo con lo juzgado por la coimmunoprecipitación. Para preguntar cuál de estos dos complejos heterodiméricos podría ser responsable de la mala respuesta al selumetinib inhibidor de MEK, se trataron tanto las células de pulmón H358 como las células de colon SW837 con una combinación de selumetinib y el inhibidor de EGFR gefitinib o la combinación del inhibidor de MEK selumetinib y el inhibidor de ERBB2 CP724714. Ninguna de estas dos combinaciones mostró una fuerte sinergia en los ensayos de proliferación a largo plazo, pero los inhibidores duales de EGFR-ERBB2 afatinib y dacomitinib mostraron cada uno una fuerte sinergia con la inhibición de MEK, tanto en células de pulmón H358 (de acuerdo con la invención) como en las células de colon SW837 (referencia) (Figuras 2 y 3). Se observaron resultados similares en tres líneas de células adicionales con mutante de KRAS: SW620 (colon), H2030 (pulmón) y H2122 (pulmón). Además, un segundo inhibidor de MEK (SSK1120212, trametinib) también mostró una fuerte sinergia con el inhibidor dual de EGFR/ERBB2 afatinib en cuatro líneas celulares diferentes de cáncer de colon (referencia) y de pulmón (de acuerdo con la invención) con mutante de KRAS. Se concluyó que la inhibición de MEK conduce a la formación de complejos heterodiméricos EGFR-ERBB3 y ERBB2-ERBB3 activos en quinasa y que ambos deben ser inhibidos para permitir que las células de cáncer de colon y de cáncer de pulmón respondan a la inhibición de MEK. Esta conclusión está respaldada por la noción de que

solamente la combinación de vectores de ARNhp contra EGFR y ERBB2 sinergizan con el inhibidor de MEK selumetinib, pero no con el vector de ARNhp solo.

La inhibición de MEK causa una sobreexpresión transcripcional dependiente de MYC de ERBB3

El inhibidor de MEK selumetinib causó un aumento tanto de ERBB3 total como de fosfo-ERBB3 activo (p-ERBB3) tanto en células de pulmón H358 como en células de colon SW837 y se observaron efectos similares para ERBB2. Se sabe que la señalización MEK-ERK mejora la estabilidad de MYC a través de la fosforilación del residuo de Serina 62 (Sears et al., 1999; Sears et al., 2000). Además, se ha demostrado que MYC es un regulador negativo de la transcripción de ERBB2 (Suen y Hung, 1991). La inhibición de MEK por selumetinib causó una disminución en la proteína MYC tanto en las células de pulmón de NSCLC como en las células de cáncer de colon, y esto fue acompañado por un aumento en la expresión del ARNm tanto de ERBB2 como de ERBB3 en múltiples líneas celulares con mutante de KRAS de pulmón y colon. Además, la inactivación de MYC por dos ARNhp independientes causó una reducción en la proteína MYC y un aumento tanto en el ARNm como de ERBB2 y ERBB3 y de proteína.

Consistente con el papel de la fosforilación de SER62 de MYC en la inducción de ERBB2 y ERBB3, se encontró que la expresión de MYC mutante fosfomimético (SER62D) (Wang et al., 2010) bloqueó efectivamente la inducción tanto de ERBB2 como de ERBB3 por el inhibidor de MEK selumetinib. La inducción de ERBB2 y ERBB3 también se observó en la mitad de 19 xenoinjertos derivados de pacientes independientes de cánceres colorrectales con mutante de KRAS que demostraron ser poco sensibles al selumetinib *in vivo* (Migliardi et al., 2012). Finalmente, se pudo obtener una biopsia pareada de un paciente que tenía un adenocarcinoma de pulmón mutado con KRAS antes y después de una semana de tratamiento con el inhibidor de MEK trametinib en el contexto de un ensayo clínico aleatorio de fase II. También en este caso, se observó la inducción tanto de ERBB2 como de ERBB3 mediante el tratamiento con inhibidores de MEK, lo que sugiere que esta activación transcripcional de RTK también puede limitar potencialmente las respuestas a la inhibición de MEK en la clínica.

La inhibición sinérgica de ERK causa la apoptosis a través de la disminución de la fosforilación de BAD.

Para abordar el mecanismo mediante el cual el inhibidor de MEK selumetinib y el inhibidor dual de ERBB2/EGFR afatinib sinergiza para reducir la viabilidad de las células de cáncer de pulmón con mutante de KRAS y de colon con mutante de KRAS se ensayo la inducción de apoptosis durante un período de 4 días en tiempo real en presencia de selumetinib, afatinib o la combinación de ambos medicamentos. Tanto las células de pulmón H358 como las células del colon SW837 mostraron únicamente una evidencia modesta de apoptosis después de la monoterapia con medicamentos, pero una inducción fuertemente sinérgica de apoptosis cuando se combinaron selumetinib y afatinib. Consistentemente, ambos medicamentos también fueron altamente sinérgicos en la inducción de PARP escindida, un sello distintivo de las células apoptóticas.

La cascada de señalización RAF-MEK-ERK inhibe la apoptosis en parte a través de la inducción de factores pro-apoptóticos BAD y BIM (Zha et al., 1996) (Corcoran et al., 2013). La inhibición de MEK-ERK induce BIM y disminuye la fosforilación inhibitoria de la BAD, que puede heterodimerizarse con BCL-XL y BCL-2, neutralizando su efecto protector y promoviendo la muerte celular. Solo la BAD no fosforilada forma heterodímeros que promueven la muerte celular (Zha et al., 1996). BAD puede ser fosforilada por las rutas de señalización PI3K-AKT y MEK-ERK en SER112 y SER136, respectivamente (Bonni et al., 1999; Datta et al., 1997; Scheid et al., 1999). Consistente con el hallazgo de que el inhibidor dual de EGFR/ERBB2 afatinib y el inhibidor de MEK selumetinib se sinergizan para inhibir la señalización de AKT y ERK, también se observó una clara inhibición sinérgica de SER112 de p-BAD por estos dos medicamentos y se suprimió la fosforilación de SER136 de BAD agregando afatinib. Además, se observa la inducción de BIM por inhibición de MEK y disminución de SER69 de p-BIM tras la inhibición de ERK. Finalmente, se probó si ambos medicamentos actuaron de forma sinérgica para inhibir el crecimiento de células de pulmón de NSCLC con mutante de KRAS en un experimento de xenoinjerto de ratón. Se observó una inhibición moderada del crecimiento tumoral por el inhibidor de MEK solo y el inhibidor dual de EGFR-ERBB2 afatinib y una inhibición completa del crecimiento tumoral durante un tiempo prolongado cuando los dos medicamentos se administraron juntos. En conjunto, estos datos sugieren una nueva terapia de combinación para el tratamiento de los cánceres de pulmón con mutante de KRAS y cáncer de colon con mutante de KRAS.

Discusión

Se describe en el presente documento el uso de una detección de letalidad sintética centrada en el kinoma para identificar quinasas potenciales cuya inhibición es sinérgica con la inhibición de MEK para el tratamiento de cánceres de pulmón con mutante de KRAS, por ejemplo, NSCLC y de colon con mutante de KRAS. Estos datos identifican al miembro de la familia del receptor tirosina quinasa ERBB3 como un "éxito" prominente en esta detección genética con el inhibidor de MEK selumetinib. ERBB3 no es una quinasa activa en sí, pero forma complejos heterodiméricos activos con uno de los otros tres miembros de la familia de genes: ERBB1 (EGFR), ERBB2 (HER2) y ERBB4 (que se expresa principalmente en el cerebro). Estos datos indican que la inhibición de MEK en las células de cáncer de pulmón y de colon causado por un mutante de KRAS conduce a la degradación de MYC, consistente con el papel establecido para la señalización de MEK-ERK en la estabilización de MYC a través de la fosforilación de la Serina 62 de MYC 62 (Sears et al., 1999; Sears et al. al., 2000). También se sabe que MYC actúa como un represor

transcripcional de ERBB2 (Suen y Hung, 1991). Se encontró en este documento que la supresión de MYC no solo activa ERBB2, sino también ERBB3, lo que indica que MYC también actúa como un represor de ERBB3. En consecuencia, la inhibición de MEK causa una sobreexpresión transcripcional tanto de ERBB2 como de ERBB3 y la formación de complejos heterodiméricos ERBB1-ERBB3 y ERBB2-ERBB3 activos en quinasa que activan la señalización PI3K-AKT y MEK-ERK en sentido descendente. Se encontró que la inhibición de EGFR o ERBB2 solamente con medicamentos de moléculas pequeñas no hizo sinergia con la inhibición de MEK, mientras que los inhibidores duales de EGFR y ERBB2, tales como afatinib y dacomitinib, mostraron una fuerte sinergia con la inhibición de MEK. Esto explica por qué solo el asociado de dimerización común de estos dos complejos activos se identificó en la detección de letalidad sintética.

Debido al aumento de la señalización de los complejos de quinasa ERBB3 activos, los inhibidores de MEK solo causaron una supresión parcial de la señalización de MEK-ERK en tumores de pulmón o colon con mutantes de KRAS, mientras que la señalización de AKT aumentó incluso en presencia de inhibidores de MEK. Por el contrario, en presencia del inhibidor de MEK selumetinib y del inhibidor dual de EGFR/ERBB2 afatinib, la señalización de MEK-ERK se inhibió más completamente y la señalización de AKT también se suprimió fuertemente. Se observó una inducción altamente sinérgica de apoptosis cuando se combinaron afatinib y selumetinib en células de cáncer de colon causado por un mutante de KRAS y de cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS. Se proporciona una posible explicación mecánica para esto al mostrar que la combinación de afatinib y selumetinib conduce a una inhibición más completa de la fosforilación de dos residuos inhibidores clave en la proteína BAD y BIM solamente proapoptóticos para BH3. Se ha demostrado anteriormente que la fosforilación de BAD en los residuos de serina 112 y 136 secuestra BAD en complejos de proteínas 14-3-3 en la membrana plasmática, inhibiendo así su acción proapoptótica y un modelo similar de inhibición por fosforilación se ha propuesto para BIM (Datta et al., 1997; Harada et al., 2004; Scheid et al., 1999; Zha et al., 1996). Estos datos sugieren un modelo en el que selumetinib y afatinib se sinergizan para desencadenar la actividad proapoptótica de BAD y BIM, lo que resulta en la muerte celular.

Estos datos identifican la liberación solamente de proteínas BH3 como eventos clave en la inducción de la muerte celular junto con la inhibición de MEK. En teoría, el uso de inhibidores en sentido ascendente, como afatinib, que interrumpe las vías MEK-ERK y PI3K-AKT, debería ser más efectivo que una inhibición más hacia abajo de las proteínas efectoras apoptóticas. De hecho, Corcoran presenció en su modelo de xenoinjerto que la mayoría de los tumores residuales mostraron una recuperación parcial de P-ERK, lo que indica que el fracaso para mantener la supresión completa de la vía MAPK puede contribuir al desarrollo de resistencia a la combinación de selumetinib más ABT-263 (Corcoran et al., 2013). Sin embargo, el éxito clínico no solo está determinado por la forma en que se inhibe el objetivo, sino también por la forma en que los pacientes toleran una combinación particular de medicamentos.

Sumario

Actualmente no hay terapias dirigidas eficaces para el 30% de todas las neoplasias malignas humanas que tienen mutaciones en los oncogenes RAS. Usando una detección de letalidad sintética centrada en el kinoma, se encontró que la supresión del receptor tirosina quinasa de ERBB3 es fuertemente sinérgica con los inhibidores de MEK en células de cáncer de pulmón causado por un mutante KRAS y células de cáncer de colon causado por un mutante KRAS. Se mostró que la inhibición de MEK da como resultado una sobreexpresión transcripcional dependiente de MYC de ERBB3, que es responsable de la resistencia a los medicamentos. Los inhibidores de molécula pequeña que se dirigen tanto a EGFR como a ERBB2, cada uno es capaz de formar heterodímeros activos con ERBB3, pueden revertir esta resistencia intrínseca al disminuir la fosforilación inhibidora de las proteínas BAD y BIM únicamente BH3 proapoptóticas y la inducción de apoptosis. Estos datos sugieren una estrategia de combinación para tratar los cánceres de pulmón causados por un mutante de KRAS y los cánceres de colon causados por un mutante de KRAS.

Las mutaciones oncogénicas en los genes RAS son frecuentes en tumores malignos humanos, pero aún no se han identificado los inhibidores eficaces de RAS. Se han desarrollado medicamentos que inhiben las quinasas RAS en sentido descendente RAF, MEK y ERK, lo que proporciona una posible estrategia para tratar los tumores causados por mutantes de RAS. Sin embargo, los estudios preclínicos y clínicos indican que los cánceres de pulmón causados por mutantes de KRAS y los carcinomas de colon causados por mutantes de KRAS manifiestan resistencia intrínseca a los inhibidores de las quinasas MEK. Se ha utilizado una detección genética de letalidad sintética para encontrar quinasas cuya supresión es fuertemente sinérgica con la inhibición de MEK en los cánceres de pulmón causados por mutantes de KRAS y los cánceres de colon causados por mutante de KRAS. Estos datos identifican una poderosa terapia de combinación para el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS y el cáncer de colon causado por un mutante de KRAS.

Referencias

Adjei, A.A., Cohen, R.B., Franklin, W., Morris, C., Wilson, D., Molina, J.R., Hanson, L.J., Gore, L., Chow, L., Leong, S., et al. (2008). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated

- protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol* 26, 2139-2146.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehar, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603-607.
- 5 Bernards, R. (2012). A missing link in genotype-directed cancer therapy. *Cell* 151, 465-468.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., y Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- 10 Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review [aparece una errata en *Cancer Res* 1990 Feb 15; 50(4): 1352]. [Revisión]. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
- Corcoran, R.B., Cheng, K.A., Hata, A.N., Faber, A.C., Ebi, H., Coffee, E.M., Greninger, P., Brown, R.D., Godfrey, J.T., Cohoon, T.J., et al. (2013). Synthetic Lethal Interaction of Combined BCL-XL and MEK Inhibition Promotes Tumor Regressions in KRAS Mutant Cancer Models. *Cancer Cell* 23, 121-128.
- 15 Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., y Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Flaherty, K.T., Infante, J.R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R.F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., et al. (2012). Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 367, 1694-1703.
- 20 Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., et al. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 809-819.
- Garnett, M.J., Edelman, E.J., Heidom, S.J., Greenman, C.D., Dastur, A., Lau, K.W., Greninger, P., Thompson, I.R., Luo, X., Soares, J., et al. (2012). Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* 483, 570-575.
- 25 Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., and Korsmeyer, S.J. (2004). Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15313-15317.
- Janne, P.A., Shaw, A.T., Pereira, J.R., Jeannin, G., Vansteenkiste, J., Barrios, C., Franke, F.A., Grinsted, L., Zazulina, V., Smith, P., et al. (2013). Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol* 14, 38-47.
- 30 Kwak, E.L., Bang, Y.J., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Solomon, B., Maki, R.G., Ou, S.H., Dezube, B.J., Janne, P.A., Costa, D.B., et al. (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363, 1693-1703.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2139.
- 35 Migliardi, G., Sassi, F., Torti, D., Galimi, F., Zanella, E.R., Buscarino, M., Ribero, D., Muratore, A., Massucco, P., Pisacane, A., et al. (2012). Inhibition of MEK and PI3K/mTOR suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in patient-derived xenografts of RAS-mutant colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res* 18, 2515-2525.
- Montero-Conde, C., Ruiz-Llorente, S., Dominguez, J.M., Knauf, J.A., Viale, A., Sherman, E.J., Ryder, M., Ghossein, R.A., Rosen, N., y Fagin, J.A. (2013). Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF mutant thyroid carcinomas. *Cancer Discov*.
- 40 Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., y Bernards, R. (2012). Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483, 100-103.
- 45 Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., y Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature reviews* 11, 761-774.
- Scheid, M.P., Schubert, K.M., y Duronio, V. (1999). Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* 274, 31108-31113.
- 50 Sears, R., Leone, G., DeGregori, J., y Nevins, J.R. (1999). Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* 3, 169-179.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., y Nevins, J.R. (2000). Multiple ras-dependent phosphorylation pathways regulate myc protein stability. *Genes Dev* 14, 2501-2514.
- Sithanandam, G., y Anderson, L.M. (2008). The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer gene therapy* 15, 413-448.
- 55 Suen, T.C., y Hung, M.C. (1991). c-myc reverses neu-induced transformed morphology by transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 11, 354-362.
- Wang, J., Kim, J., Roh, M., Franco, O.E., Hayward, S.W., Wills, M.L., y Abdulkadir, S.A. (2010). Pim1 kinase synergizes with c-MYC to induce advanced prostate carcinoma. *Oncogene* 29, 2477-2487.
- Weinstein, I.B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes-the Achilles heel of cancer. *Science* 297, 63-64.
- 60 Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., y Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor de MEK para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS, preferiblemente en el que el cáncer se **caracteriza por** la expresión de HER3, en el que el inhibidor de MEK se administra simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de EGFR y simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de ERBB2, en el que:
- 10 a) el inhibidor de MEK es Selumetinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y se compone de Dacomitinib o Afatinib o
b) el inhibidor de MEK es Trametinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consiste en Afatinib.
- 15 2. Un inhibidor de EGFR para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS, preferiblemente en el que el cáncer se **caracteriza por** la expresión de HER3, en el que el inhibidor de EGFR se administra simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de ERBB2 y simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de MEK, en el que:
- 20 a) el inhibidor de MEK es selumetinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consisten en Dacomitinib o Afatinib, o
b) el inhibidor de MEK es Trametinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consiste en Afatinib.
- 25 3. Un inhibidor de ERBB2 para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS, preferiblemente en el que el cáncer se **caracteriza por** la expresión de HER3, en el que el inhibidor de ERBB2 se administra simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de EGFR y simultánea, separada o secuencialmente con un inhibidor de MEK, en el que:
- 30 a) el inhibidor de MEK es Selumetinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consisten en Dacomitinib o Afatinib, o
b) el inhibidor de MEK es Trametinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consiste en Afatinib.
- 35 4. Un producto que comprende un inhibidor de MEK, un inhibidor de EGFR y un inhibidor de ERBB2 como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS, preferiblemente en el que el cáncer se **caracteriza por** la expresión de HER3, en el que
- 40 a) el inhibidor de MEK es Selumetinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consisten en Dacomitinib o Afatinib, o
b) el inhibidor de MEK es Trametinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consiste en Afatinib.
- 45 5. Una combinación farmacéutica terapéutica que comprende un inhibidor de MEK, un inhibidor de EGFR y un inhibidor de ERBB2, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer de pulmón causado por un mutante de KRAS, preferiblemente en el que el cáncer se **caracteriza por** la expresión de HER3, en el que:
- 50 a) el inhibidor de MEK es Selumetinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consisten en Dacomitinib o Afatinib, o
b) el inhibidor de MEK es Trametinib y el inhibidor de EGFR y el inhibidor de ERBB2 son el mismo inhibidor y consisten en Afatinib.

Figura 1

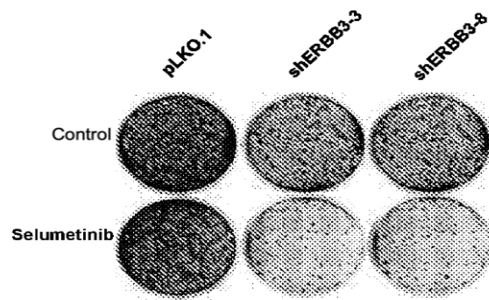


Figura 2

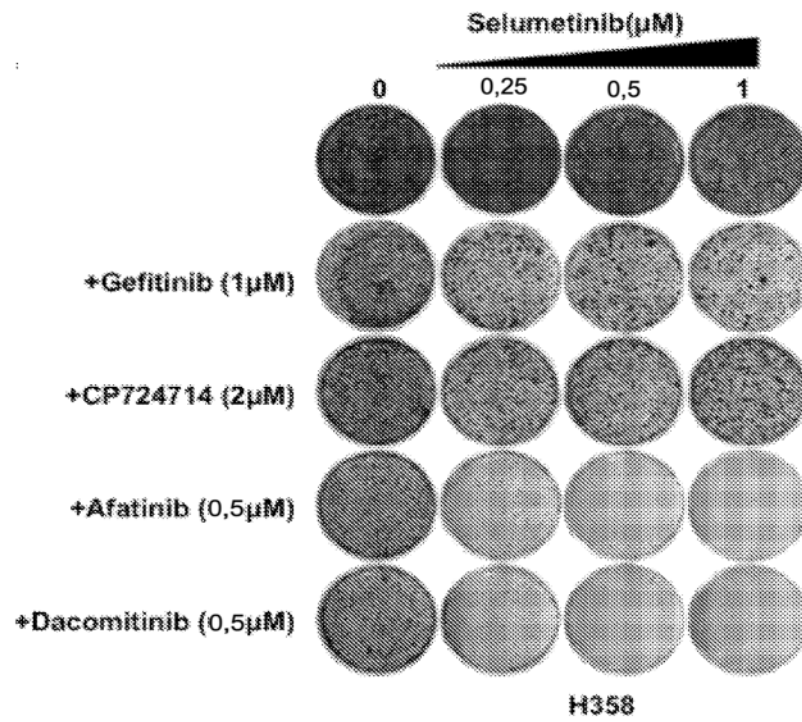


Figura 3

