

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 569**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2014 PCT/EP2014/059797**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184211**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2014 E 14725091 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2997376**

54 Título: **Biomarcadores de pronóstico y predictivos y aplicaciones biológicas de los mismos**

30 Prioridad:

13.05.2013 EP 13305603

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

21.04.2021

73 Titular/es:

**INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (100.0%)
39, rue Camille Desmoulins
94800 Villejuif, FR**

72 Inventor/es:

**ROBERT, CAROLINE;
BOUSSEMART, LISE;
GIRAULT, ISABELLE y
VAGNER, STÉPHAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 820 569 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

Biomarcadores de pronóstico y predictivos y aplicaciones biológicas de los mismos

La presente invención se refiere a un método para evaluar la sensibilidad o la resistencia de una célula cancerosa frente a un tratamiento terapéutico. Se refiere además al tratamiento de un cáncer con un inhibidor del complejo eIF4F usado para la sensibilización de dicho cáncer frente a un tratamiento terapéutico.

Antecedentes de la técnica

La activación de una o ambas de las dos rutas MAP quinasa y PI3 quinasa está implicada en muchos cánceres, que incluyen melanoma, cáncer de célula renal, algunos cánceres colorrectales, de mama y de pulmón, por ejemplo. Por ejemplo, se usan inhibidores de mTOR para tratar inhibidores de RCC y BRAF para el tratamiento de melanoma.

En particular, la ruta Ras/Raf/MEK/ERK es crítica para la supervivencia, crecimiento, proliferación y tumorigénesis de las células. Las Raf quinastas existen en tres isoformas, A-Raf, B-Raf y C-Raf. De las tres isoformas, existen estudios que han demostrado que la B-Raf (codificada por el gen BRAF) actúa como activador MEK primario y es uno de los genes mutados más frecuentemente en cánceres humanos. La B-Raf quinasa representa una diana excelente para la terapia anticáncer. En particular, la acción sobre la ruta de MAP quinasa con un agente anti-BRAF específico es una de las estrategias que ha demostrado una tasa de respuesta sin precedentes y un beneficio en la supervivencia general en pacientes de melanoma con metástasis (Flaherty 2010; Chapman et al 2011). Esta última terapia dirigida puede proponerse para pacientes cuyos melanomas albergan una mutación en la posición V600 del oncogén BRAF, conduciendo a la activación constitutiva de la ruta *MAPK*, que se da en el 40 al 50% de los melanomas.

La terapia dirigida con vemurafenib (Roche / Plexxikon) ha demostrado un beneficio de supervivencia en comparación con la quimioterapia en estos pacientes (Chapman et al 2011). Aunque el vemurafenib induce claramente respuestas tempranas objetivas en más del 50% de los pacientes, su eficacia normalmente es de corta duración, y casi el 100% de los pacientes recaen pasados de 6 a 12 meses de la terapia. Ésta es la razón por la que, aunque la diferencia en la supervivencia sin progresión es muy significativa (6,8 meses frente a 1,6 meses (ratio de peligro 0,38 (IC 95%: 0,32-0,46) Log-rank $p < 0,001$), el beneficio en la supervivencia global es menos impresionante: 13,6 meses frente a 9,7 meses (ratio de peligro 0,70* (IC 95%: 0,57-0,87); $p < 0,001$). Para aproximadamente el 15% de los pacientes, aunque el melanoma alberga una mutación v600 BRAF, la terapia anti-BRAF no previene el crecimiento tumoral. Esto es lo que llamamos resistencia primaria, en contraposición con las resistencias secundarias que se producen en la mayoría de los pacientes estabilizados inicialmente o que responden.

Para la resistencia secundaria, se han identificado varios mecanismos (Fedorenko, 2011). Normalmente se clasifican en dos categorías:

1. Aquellas que re-activan la ruta MAPK que conduce a la re-fosforilación de ERK: p.ej., amplificación o variación de isoforma de BRAF, activación de la ruta dependiente de Ras en dirección 5', activación de ERK en dirección 3';
2. Aquellas que son independientes de la activación de ERK, que implican una ruta de proliferación alternativa, después, por ejemplo, de activación de PDGFR o IGF1R.

Las resistencias primarias se han investigado en mucha menor medida. Recientemente, se ha demostrado que la presencia de HGF en el microentorno era un factor de resistencia primaria en pacientes tratados con BRAF vía estimulación EMT, capaz de activar CRAF, activando con ello la ruta de MAP quinasa de forma independiente a BRAF. (Straussman, 2012; Wilson, 2012).

Se están desarrollando otros inhibidores de BRAF, como el dabrafenib (GSK) que ha demostrado una eficacia similar en los pacientes con tasas elevadas de respuesta (50%), un aumento significativo de la supervivencia sin progresión, 5,1 meses frente a 2,7 con quimioterapia, una ratio de peligro de 0,30 (IC 95%: 0,18, 0,51); $p < 0,0001$) y un desarrollo frecuente y temprano de resistencias (Hauschild, 2012). La combinación de inhibidores de BRAF y MEK es actualmente el régimen que proporciona las mejores tasas de respuesta con un tiempo medio a progresión significativamente mayor que cada uno de los fármacos por separado (9,7 meses frente a de 5 a 6 meses) (Flaherty, 2012). Esta combinación proporciona niveles muy altos de tasa de respuesta inicial (hasta el 76%). Sin embargo, se producen resistencias cuyos mecanismos subyacentes no están igual de bien identificados.

Aguas abajo y en la convergencia de estas dos rutas oncogénicas críticas: MAPK y PI3K, encontramos la maquinaria molecular que regula la expresión génica mediante un ajuste fino de los procesos de traducción de ARNm.

Dicha regulación de la expresión génica es fundamental para proporcionar información sobre los procesos biológicos. Más específicamente, la fase de inicio de la traducción de ARNm ha ganado una importancia creciente por su papel en el establecimiento de los patrones de expresión génica correctos durante el desarrollo y las enfermedades. La traducción de ARNm en células eucarióticas está separado tanto física como temporalmente de la transcripción. Esto proporciona a las células opciones extendidas para alterar su proteoma mediante una potencial imposición de un control traduccional cambiado en transcritos ya presentes en el transcriptoma. La traducción de ARNm "dependiente de Cap" se basa en parte en un complejo de proteínas denominado eIF4F, que se une al cap 7-metil-guanina localizado

en los ARNms de extremo 5' (Silvera, 2010; Blagden, 2011). eIF4F comprende 3 proteínas principales: la proteína de unión a cap eIF4E, eIF4G que actúa como estructura, y eIF4A, que presenta actividad de ARN helicasa. Uno de los factores limitantes es el eIF4E, cuya biodisponibilidad puede estar modulada por el nivel de fosforilación de proteínas de unión a eIF4E (4EBPs). De hecho, se ha observado que el eIF4E está sobreexpresado en una variedad de cánceres. Se considera como un oncogén desde hace más de 15 años. El efecto mediado por eIF4E sobre la transformación y tumorigénesis celulares se basa en su capacidad para aumentar la traducción de un subconjunto de ARNms que tienen regiones no traducidas 5' altamente estructuradas (5'UTR). Dichos ARNms tienen una capacidad más débil para competir por la unión de eIF4E, siendo el eIF4E un factor limitante de la velocidad. De hecho, los ARNms con 5'UTR altamente estructuradas, tal como los que codifican proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular (MYC, CCND1, ODC), la angiogénesis (VEGFA, FGF2) y el crecimiento celular y las funciones de supervivencia, son reclutados mejor a ribosomas, y por tanto son traducidos mejor en condiciones de sobreexpresión de eIF4E.

Como se ha indicado anteriormente, el eIF4F está localizado en la convergencia de las dos rutas de señalización que son críticas en la biología tumoral, y en particular en la biología del melanoma: la ruta MAPK y la ruta PI3K. Mientras que 4EBP1, el represor de eIF4E, es fosforilado por mTOR (aguas debajo de PI3K/Akt), eIF4E y eIF4G son fosforilados por Mnk quinasas (aguas debajo de MEK/ERK). Esto ha conducido al análisis de la expresión/fosforilación de eIF4E, eIF4G y 4EBP1 como marcadores predictivos/prognósticos en el cáncer.

Se ha demostrado una correlación entre la sensibilidad o la resistencia de un tumor frente a un agente anti-tumoral (tal como cetuximab) y la cantidad de complejo Cap-OFF (proteína 4EBP1 ligada a proteína eIF4E) en dicho tumor (Zindy, 2011).

Los inventores de la presente demuestran que la determinación del estatus de la interacción de eIF4E con eIF4G en el complejo de inicio de traducción de eIF4F activo y con su represor 4EBP1 es un marcador valioso para la evaluación de la sensibilidad de una célula cancerosa frente a un tratamiento terapéutico.

Sumario

La presente invención se basa en el descubrimiento por parte de los inventores de que el estatus de la interacción de la proteína de unión cap eIF4E con sus compañeros eIF4G o 4EBP1 en una célula cancerosa se correlaciona con la sensibilidad de dicha célula frente a un tratamiento de cáncer. Por definición, "Cap-OFF" designa en la presente memoria el complejo formado por la interacción de eIF4E con su compañero 4EBP1 y "Cap-ON" designa el complejo formado por la interacción de eIF4E con su compañero eIF4G.

La terapia contra el cáncer personalizada en particular se basa en biomarcadores capaces de predecir la respuesta de un tumor individual a un tratamiento contra el cáncer. En la presente memoria se describen herramientas ventajosas utilizables en el seguimiento, tratamiento y cura "personalizados" de un sujeto que padece un cáncer.

En la presente memoria se describe un método para diagnosticar, evaluar o monitorizar la sensibilidad o resistencia de un sujeto que tiene un tumor frente a un tratamiento contra el cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o de la ruta PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK. Dicho método puede usarse de forma ventajosa para evitar o detener un tratamiento inútil. Dicho método de la invención comprende preferiblemente una etapa de determinación, en una muestra biológica de dicho sujeto, en particular en una célula cancerosa, el estatus de Cap-ON o Cap-OFF del complejo eIF4F tal como se explica más adelante, determinando o monitorizando de este modo si el sujeto que tiene un tumor responde o es resistente al tratamiento contra el cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK. La invención se refiere al uso del estatus Cap-ON o Cap-OFF del complejo eIF4F, en particular a las cantidades relativas de Cap-ON o Cap-OFF (p.ej., la ratio) tal como se explica más adelante para el diagnóstico, la evaluación o la monitorización de la sensibilidad o la resistencia de un sujeto que tiene un tumor frente a un tratamiento contra el cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o de la ruta PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK.

En particular, la presente invención se refiere adicionalmente a un método para evaluar la sensibilidad de un tumor frente a un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK, que comprende determinar la cantidad de complejo eIF4E-eIF4G (complejo Cap-ON) y la cantidad de complejo eIF4E-4EBP (complejo Cap-OFF) en dicho tumor o en células tumorales derivadas del mismo, y correlacionar un aumento del complejo Cap-OFF en comparación con el complejo Cap-ON con la sensibilidad frente al agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o la PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK.

La invención también se refiere a un método para evaluar la resistencia de un tumor frente a un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAP-quinasa o de la ruta PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAP-quinasa, que comprende determinar la cantidad de complejo eIF4E-eIF4G (complejo Cap-ON) y la cantidad de complejo eIF4E-4EBP (complejo Cap-OFF) en dicho tumor o en células tumorales derivadas del mismo y correlacionar un aumento del complejo Cap-ON en comparación con el complejo Cap-OFF con la resistencia al inhibidor de la ruta MAP-quinasa.

5 En una realización particular, el tumor es un melanoma, un cáncer renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama, un cáncer tiroideo o un cáncer de pulmón. En una realización preferida, el tumor es un melanoma, un cáncer de colon un cáncer tiroideo, en particular un melanoma, más particularmente un melanoma con metástasis. Un tumor representativo tal como un melanoma, un cáncer de colon o un cáncer tiroideo es un tumor que alberga una mutación en BRAF, en particular una mutación en la posición de aminoácido V600, más particularmente la mutación V600E.

10 El agente antitumoral puede ser un inhibidor de la ruta MAPK, un inhibidor de la ruta PI3K o un inhibidor de un factor de crecimiento o de una señalización de factor de crecimiento tal como un inhibidor de VEGF, o una combinación de ambos. En una realización particular, el tratamiento corresponde a la administración de un inhibidor de la ruta MAPK, en particular un inhibidor de BRAF, MEK o MNK, o una combinación de los mismos. Los inhibidores de BRAF representativos incluyen en particular inhibidores de un mutante BRAF V600E tal como Sorafenib, PLX-4720, Vemurafenib, Dabrafenib o LGX818. Los inhibidores de MEK representativos incluyen PD0325901, Trametinib, selumetinib y GDC0973.

Preferiblemente, la cantidad de los complejos de eIF4F Cap-ON y Cap-OFF se determina usando un ensayo de ligación de proximidad (PLA) o un ensayo de unión CAP.

15 Preferiblemente, el método comprende además una etapa de comparación de la cantidad relativa de los complejos Cap-OFF y Cap-ON en el tumor con un nivel de referencia. Más preferiblemente, el nivel de referencia es la cantidad de los complejos Cap-OFF y Cap-ON en el tumor del sujeto antes o al inicio del tratamiento con el agente antitumoral (también denominado pre-terapéutico).

20 Si el sujeto es identificado, usando un método según la presente invención, como resistente o que no responde a un tratamiento particular contra el cáncer, el método de forma ventajosa comprende adicionalmente una etapa de selección de una "molécula compensatoria", para ser usada, sola o en combinación con el tratamiento particular contra el cáncer, como el tratamiento terapéutico apropiado para el cáncer del sujeto.

25 Por tanto, en la presente memoria se describe adicionalmente un método para seleccionar un tratamiento terapéutico del cáncer apropiado, preferiblemente óptimo, para un sujeto que tiene un tumor, así como las moléculas compensatorias para uso en dicho tratamiento contra el cáncer, preferiblemente en combinación con un tratamiento contra el cáncer convencional en un sujeto identificado, usando un método como el descrito en la presente memoria, como resistente al tratamiento convencional contra el cáncer.

30 En una realización particular, el método para seleccionar un tratamiento apropiado contra el cáncer para un sujeto que tiene un tumor comprende una etapa de determinación de la ratio de los complejos de eIF4F Cap-ON y Cap-OFF en una muestra tumoral de dicho sujeto. Preferiblemente, el método comprende además una etapa de comparación de la cantidad relativa de los complejos Cap-OFF y Cap-ON en el tumor con un nivel de referencia. Más preferiblemente, el nivel de referencia es la cantidad de los complejos es la cantidad de los complejos Cap-OFF y Cap-ON en el tumor del sujeto antes o al inicio del tratamiento con el agente antitumoral (también denominado pre-terapéutico). En particular, el método comprende una etapa de determinación de la cantidad de las formas Cap-OFF y Cap-ON del complejo de eIF4F en una muestra biológica de dicho sujeto, siendo una ratio Cap-OFF/Cap-ON elevada en la muestra biológica un indicio de que el tratamiento con un agente antitumoral será eficaz en el sujeto, y siendo una ratio Cap-OFF/Cap-ON baja en la muestra biológica un indicio de que el tratamiento con un agente antitumoral no será eficaz en el sujeto. Cuando un tratamiento es eficaz (es decir, un sujeto que responde), dará como resultado un aumento de la ratio Cap-OFF/Cap-ON en comparación con la ratio Cap-OFF/Cap-ON pre-terapéutica (siendo preferiblemente la ratio de referencia para un paciente dado). Si la ratio Cap-OFF/Cap-ON en el tumor no aumenta durante la terapia, o disminuye durante la terapia, esto indica que el tratamiento antitumoral no será eficaz en el sujeto (es decir, un sujeto que no responde). En particular, una ratio elevada es una ratio incrementada respecto a la ratio pre-terapéutica y una ratio baja es una ratio igual o disminuida respecto a la ratio pre-terapéutica.

45 En otra realización particular, el método comprende una etapa de determinación de la ratio Cap-OFF/Cap-ON en una muestra de tumor de dicho sujeto, siendo una ratio baja, en particular cuando se compara con la ratio pre-terapéutica, un indicio de que preferiblemente debería administrarse o añadirse a la terapia evaluada otra molécula para el tratamiento contra el cáncer.

50 En la presente memoria también se describe un método para cribar o identificar un compuesto adecuado para mejorar el tratamiento contra un cáncer (identificado también en la presente memoria como "molécula compensatoria") en un sujeto que tiene un tumor, comprendiendo dicho método la determinación de la capacidad de un compuesto de ensayo para aumentar la ratio de complejo eIF4F Cap-OFF/Cap-ON.

55 En la presente memoria también se describe el uso de una molécula compensatoria que aumenta la ratio de complejo eIF4F Cap-OFF/Cap-ON para tratar un cáncer o para preparar una composición farmacéutica para tratar un cáncer en un sujeto identificado, mediante un método como el descrito en la presente memoria, como resistente frente al tratamiento contra el cáncer, típicamente un tratamiento contra el cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o la ruta PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK. La presente invención se refiere por tanto a un compuesto que aumenta la ratio Cap-OFF/Cap-ON del complejo eIF4F, para uso en un método de sensibilización de un sujeto frente a un tratamiento de un cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un

inhibidor de la ruta MAPK y/o de la ruta PI3-quinasa, preferiblemente un inhibidor de BRAF y/o MEK como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, el compuesto o la molécula compensatoria es hippuristanol, silvestrol o un análogo de los mismos.

5 Adicionalmente, en la presente memoria se describe un método para tratar el cáncer que comprende la administración a un sujeto que lo necesite, como se ha explicado previamente, de una molécula compensatoria, preferiblemente junto con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o la ruta PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK, siendo las moléculas administrables juntas o por separado en un protocolo común o único.

10 Por consiguiente, la presente solicitud se refiere además a un producto de combinación que comprende un inhibidor del complejo de eIF4F, en particular hippuristanol o silvestrol o un análogo de los mismos, en combinación con un inhibidor de la ruta MAPK y/o la ruta PI3-quinasa, preferiblemente un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un cáncer. Más particularmente, se refiere a un producto de combinación que comprende hippuristanol o silvestrol, o un análogo de los mismos, en combinación con cualquiera de los inhibidores proporcionados más adelante, en particular en combinación con sorafenib, PLX-4720, vemurafenib, dabrafenib, LGX818, PD0325901, selumetinib, GDC0973 o trametinib.

15 En la presente memoria también se describe un método para determinar el pronóstico de un cáncer en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de determinar, en una muestra biológica de dicho sujeto, la ratio de complejo de eIF4F Cap-OFF/Cap-ON, evaluando con ello el pronóstico del cáncer en el sujeto.

20 En la presente memoria también se describe un kit para evaluar o monitorizar la sensibilidad o la resistencia de un sujeto que tiene un tumor frente a un tratamiento contra el cáncer, en particular un tratamiento con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o la ruta PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK, o el pronóstico de un cáncer en un sujeto, donde el kit comprende (i) medios para evaluar la cantidad de los complejos de eIF4F Cap-OFF y Cap-ON, tal como los medios para implementar un ensayo de ligación de proximidad (PLA) o un ensayo de unión CAP y, opcionalmente, (ii) un panfleto que proporciona el valor cuantitativo de la ratio de control correspondiente a la ratio en una población de control que puede ser una población de control sensible o una población de control resistente. La presente invención también se refiere al uso de un kit que comprende medios para evaluar la cantidad de los complejos de eIF4F Cap-OFF y Cap-ON, tal como los medios para implementar un ensayo de ligación de proximidad (PLA) o un ensayo de unión CAP, para evaluar o monitorizar la sensibilidad o la resistencia de un sujeto que tiene un tumor frente a un tratamiento contra el cáncer, en particular un tratamiento con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o la ruta PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK.

Leyendas de las figuras

35 Figura 1: Ensayo de inhibición de crecimiento a corto plazo de un panel de líneas celulares de melanoma que incluyen líneas celulares BRAF (V600E) y una línea celular mutada NRAS (Q61R). **A.** Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de N-[3-[(5-cloro-1H-pirroló[2,3-b]piridin-3-il)carbonil]-2,4-difluorofenil]-1-propano-sulfonamida (PLX-4720) durante 72h y se determinó la viabilidad celular usando CellTiter-Blue midiendo la absorbancia a 540nm en un lector de placas. Las barras de error muestran los datos \pm error estándar. Las medias se obtuvieron a partir de cuatro réplicas (n = 4). **B.** Ensayo de formación de colonia a largo plazo de las células indicadas. Las células fueron crecidas en ausencia o en presencia de PLX-4720 en las concentraciones indicadas durante 15-20 días. Para cada línea celular, todas las placas fueron fijadas al mismo tiempo, teñidas y fotografiadas.

40 Figura 2: Las respuestas bioquímicas de las células indicadas frente a PLX-4720 fueron documentadas mediante análisis de transferencia "western blot" para las proteínas indicadas totales y fosforiladas ("P-").

Figura 3: Examen de la formación del complejo de eIF4F mediante el "ensayo de unión cap" en las líneas celulares indicadas. Se analizaron los eluatos de las partículas (ligadas a m7G) y los extractos totales (entrada) en electroforesis de gel de 4% a 12%, seguido de análisis de transferencia Western con los anticuerpos indicados.

45 Figura 4: Las interacciones entre eIF4E y eIF4G ("Cap-ON") y entre eIF4G y 4EBP1 (interacción "Cap-OFF") (A) se visualizan mediante la técnica PLA, y (B) se cuantifican (número de puntos por cada 100 núcleos) usando ImageJ para las líneas celulares y los tratamientos indicados.

50 Figura 5: Las interacciones entre eIF4E y eIF4G ("Cap-ON") y entre eIF4G y 4EBP1 (interacción "Cap-OFF") (A) se visualizan mediante la técnica PLA, y (B) se cuantifican (número de puntos por cada 100 núcleos) usando ImageJ para las líneas celulares y los tratamientos indicados. (C) Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de (PLX-4720) durante 72h y se determinó la viabilidad celular usando CellTiter-Blue midiendo la absorbancia a 540nm en un lector de placas. Las barras de error muestran los datos \pm error estándar. Las medias se obtuvieron a partir de cuatro réplicas (n = 4).

55 Figura 6: Las interacciones entre eIF4E y eIF4G ("Cap-ON") y entre eIF4G y 4EBP1 (interacción "Cap-OFF") (A) se visualizan mediante la técnica PLA en muestras de melanoma humano fijadas con formalina procedentes de un paciente dado (denominado #1). D: Día. Los números se refieren al número de días antes (-) o después (+) de la

administración de vemurafenib. (B) y (C): Cuantificación de la interacción “Cap-ON” y “Cap-OFF” (determinada mediante PLA) en cinco pacientes.

5 Figura 7: a. Ensayo de inhibición del crecimiento a corto plazo de las líneas celulares indicadas (SK-Mel28, A375, Mel888, SK-Mel5, A2058, Mel624 y Mel10) tratadas con concentraciones crecientes de vemurafenib, PD0325901 y CGP 57380 durante 48 h. La línea celular Mel10 no está mutada en el gen BRAF y se usó como línea celular de control insensible a vemurafenib. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de proliferación celular WST-1. Los datos son las medias \pm s.d. (n=3). b. Ensayo de formación de colonia a largo plazo de las líneas celulares indicadas. Las células fueron crecidas en ausencia o en presencia de vemurafenib a las concentraciones indicadas durante dos semanas. Para cada línea celular, todas las placas fueron fijadas al mismo tiempo, teñidas y fotografiadas.

10 Figura 8: a. Crecimiento de células A375 y Mel624 como xenoinjertos tumorales en ratones *nude* tratados con vehículo y concentraciones crecientes de PLX4720 (Plx). Se muestran los volúmenes tumorales medios \pm s.d.s de la media (n=3-5 ratones por grupo). Los datos son las medias \pm s.e.m. (n=5-6 ratones por grupo). La significancia se determinó mediante el test U de Mann-Whitney de un solo lado (*P<0,05, **P<0,01). b. Interacciones entre eIF4E y eIF4G (eIF4E-eIF4G) o eIF4E y 4EBP1 (eIF4E-4EBP1) detectadas mediante ensayo de ligación de proximidad *in situ* de secciones de tejido embebido en parafina de xenoinjertos A375 y Mel624 de ratones PLX4720-fed. Las interacciones se visualizaron como puntos fluorescentes morados. c. Cuantificación del ensayo de ligación de proximidad que muestra la ratio entre el número de puntos morados correspondientes a las interacciones entre eIF4E-eIF4G por cada 100 núcleos y el número de puntos morados correspondientes a las interacciones entre eIF4E-4EBP1 por cada 100 núcleos, normalizado a la misma ratio antes del tratamiento. Las barras de error muestran los datos \pm s.d.

20 Figura 9: La formación del complejo de inicio de la traducción eIF4F se asocia a la resistencia a inhibidores anti-BRAF. a. Cuantificación del ensayo de ligación de proximidad que muestra el número de puntos rojos (correspondientes a las interacciones entre eIF4E-eIF4G o eIF4E-4EBP1) por cada 100 núcleos (cuantificados con el software Velocity). Los datos son medias \pm s.d. (n=3). Significancia determinada mediante test U de Mann-Whitney (*P<0,05, **P<0,01). b. Interacciones eIF4E-eIF4G y eIF4E-4EBP1 detectadas mediante ensayo de ligación de proximidad *in situ* en línea celular de cáncer de colon HT29 tratada (24 h) con vemurafenib (6 μ M) o no tratada, y línea de cáncer de tiroides BCPAP, respectivamente. Las interacciones fueron visualizadas como puntos fluorescentes rojos mediante el escáner Olympus VS120. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul).

30 Figura 10: Las moléculas dirigidas a eIF4F presentan sinergia con vemurafenib. a. Ensayo de inhibición del crecimiento a corto plazo de las líneas celulares indicadas tratadas con concentraciones crecientes de 4EGi-1 (panel superior) y vemurafenib (panel inferior) durante 48 h. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de proliferación celular WST-1. Los datos son las medias \pm s.d. (n=4). b. Isoblograma que muestra la correlación entre los efectos observados y esperados de la combinación de vemurafenib y 4EGi-1 en Mel624. La región superior izquierda de la figura representa grados crecientes de sinergia. Los valores de índice Bliss mínimo y máximo se mostraron como un intervalo entre corchetes para cada isoblograma. El índice Bliss se calculó como la ratio Observado/Esporado, donde un índice =1, <0 y >1 indica efectos aditivos, antagonistas y sinérgicos, respectivamente.

40 Figura 11: Formación del complejo eIF4F en pacientes. a. Interacciones eIF4E-eIF4G y eIF4E-4EBP1 detectadas mediante ensayo de ligación de proximidad *in situ* en las muestras tumorales tomadas de dos pacientes (Paciente #1 y #6), antes y después del tratamiento con vemurafenib. El tumor del paciente #1 respondió al vemurafenib, mientras que el tumor del paciente #6 fue resistente al vemurafenib. Cada punto morado representa una interacción. b. Cuantificación del ensayo de ligación de proximidad que muestra la ratio entre el número de puntos morados correspondientes a las interacciones eIF4E-eIF4G por cada 100 núcleos y el número de puntos morados correspondientes a las interacciones eIF4E-4EBP1 por cada 100 núcleos, normalizada a la misma ratio antes del tratamiento (Día 0). Las barras de error muestran los datos \pm s.d. Para cada muestra, se evaluaron los niveles de inmunorreactividad de ERK fosforilada de forma semi-cuantitativa (barras grises). Se representan cuatro tumores que responden clínicamente en el gráfico de la izquierda, y en el gráfico de la derecha se representan cinco tumores clínicamente resistentes. El paciente #4 presentó una respuesta disociada 21 días después del inicio del tratamiento anti-BRAF (M1 respondía mientras que M2 crecía). Al paciente #3 se le practicó una biopsia en el día 26 durante la respuesta clínica y en el día 138 cuando recayó. D: día. El número corresponde al día de la biopsia antes (-) o después (+) del inicio del tratamiento anti-BRAF.

50 **Descripción detallada de la invención**

Los inventores de la presente memoria describen a continuación los medios para determinar predictivamente si un sujeto que tiene un tumor responderá a un tratamiento contra el cáncer, en particular a un tratamiento contra el cáncer que comprende la administración de un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, o un inhibidor de un factor de crecimiento o de una señalización de factor de crecimiento, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK, o si será resistente a dicho tratamiento, y/o (ii) para evaluar el pronóstico de un cáncer en un sujeto que tiene un tumor, es decir, para evaluar si el sujeto sobrevivirá al cáncer o fallecerá por el cáncer.

En el contexto de la presente invención, el paciente o sujeto es un mamífero que tiene un tumor. En una realización particular, el mamífero es un ser humano, independientemente de su edad o sexo. Sin embargo, también se contemplan aplicaciones veterinarias en la presente invención.

A menos que se especifique lo contrario en la presente descripción, el tumor es un tumor maligno o canceroso. En la presente invención, el cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer o neoplasia. En una realización específica, el tumor es un melanoma, un cáncer renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama, un cáncer tiroideo o un cáncer de pulmón. Preferiblemente, el cáncer o neoplasia está mediado por las rutas de señalización MAPK y/o PI3K, preferiblemente por la ruta MAPK. En una realización específica, el cáncer preferiblemente es un melanoma, en particular un melanoma con metástasis, más particularmente un melanoma que alberga una mutación en BRAF, en particular una mutación en la posición de aminoácido V600, lo más particularmente la mutación V600E.

En una realización particular y preferida de la presente invención, el sujeto típicamente es un sujeto que está siendo sometido a un tratamiento contra el cáncer, en particular con un agente antitumoral, preferiblemente uno o más inhibidores de las rutas de señalización MAPK y/o PI3K, y/o uno o más inhibidores de un factor de crecimiento o de una ruta de señalización de factor de crecimiento, de forma aún preferible uno o más inhibidores de la ruta MAPK. Esto significa que, típicamente, antes de evaluar el pronóstico de un cáncer en un sujeto, o antes de evaluar la sensibilidad o la resistencia del sujeto frente a un tratamiento particular contra el cáncer, dicho sujeto ha sido expuesto a dicho tratamiento particular contra el cáncer (es decir, dicho agente antitumoral). El sujeto puede haber sido expuesto a parte de un protocolo de tratamiento convencional completo, por ejemplo, a al menos un ciclo de todo el protocolo de tratamiento, por ejemplo, a dos, tres o cuatro ciclos de todo el protocolo de tratamiento.

En otra realización particular de la presente invención, el método para evaluar el pronóstico de un cáncer en un sujeto o el método para evaluar la sensibilidad o la resistencia de un sujeto a un tratamiento contra el cáncer se aplica a un sujeto que no ha sido expuesto previamente a un tratamiento convencional contra el cáncer.

El término "muestra biológica" significa cualquier muestra biológica derivada de un paciente. Los ejemplos de tales muestras incluyen fluidos, tejidos, muestras celulares, órganos, biopsias, etc. Las muestras más preferidas son muestras de cáncer o de tejido tumoral, en particular muestras de tumor de tiroides, pulmón, piel, intestino, en particular colorrectales, útero, ovario, mama, renal, pulmón, hueso o cabeza y cuello. También se puede usar sangre, plasma, suero, saliva, orina, fluido seminal y lavado broncoalveolar (BAL), etc. También pueden usar células cancerosas procedentes de una metástasis o células cancerosas obtenidas de sangre, tal como células tumorales en circulación. La muestra biológica del sujeto preferiblemente se selecciona de una muestra de tumor. La muestra biológica puede ser tratada antes de su uso, p.ej. para aumentar la disponibilidad de proteínas. Las técnicas de lisis celular, concentración dilución de ácidos nucleicos o proteínas, son conocidas por los especialistas en la técnica.

En el contexto de esta invención, "que no responde" o "resistente" se refiere al fenotipo de un sujeto que no responde a un tratamiento contra el cáncer, es decir, el volumen del tumor no disminuye sustancialmente, o los síntomas del cáncer en el sujeto no se ven aliviados, o el cáncer progresa, por ejemplo, el volumen del tumor aumenta y/o el tumor genera metástasis local o distante. El término "que no responde" o "resistente" también se refiere al fenotipo de un sujeto que fallecerá debido al cáncer.

En el contexto de esta invención, "que responde" o "sensible" se refiere al fenotipo de un paciente que responde a un tratamiento contra el cáncer, es decir, el volumen del tumor disminuye, al menos uno de sus síntomas es aliviado, o el desarrollo del cáncer es detenido o frenado. Típicamente, un sujeto que responde a un tratamiento contra el cáncer es un sujeto que será tratado completamente (curado), es decir, un sujeto que sobrevivirá al cáncer. Un sujeto que responde a un tratamiento contra el cáncer también es, en el sentido de la presente invención, un sujeto que típicamente tiene una probabilidad de supervivencia libre de enfermedad (DFS) mayor que un paciente que ha sido identificado, con un método como el descrito en la presente memoria, como resistente a un tratamiento contra el cáncer.

La sensibilidad o susceptibilidad de un sujeto frente a un tratamiento contra el cáncer indica si el sujeto "responde" o "no responde", en otras palabras si el sujeto será o no será tratado al menos parcialmente (retraso o regresión del crecimiento tumoral), preferiblemente será tratado completamente (curado), con dicho tratamiento contra el cáncer.

La expresión "predecir" en la presente memoria se refiere a la probabilidad de que un sujeto responda o no a un tratamiento contra el cáncer, y también al grado de respuesta. Se pueden usar métodos predictivos de la invención clínicamente para adoptar decisiones de tratamiento eligiendo las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier sujeto particular. Por tanto, la presente invención también se refiere a un método para seleccionar un sujeto que padece un cáncer para un tratamiento con un agente antitumoral particular, que comprende la determinación de la ratio de complejo de eIF4F Cap-OFF/Cap-ON en una muestra biológica de dicho sujeto, y seleccionar al sujeto que se predice que responderá a dicho tratamiento.

Por definición, Cap-OFF designa el complejo formado por la interacción de la proteína de unión cap eIF4E (factor 4E de inicio de traducción eucariótica; NCBI Gen ID: 1977; UniProtKB/Swiss-Prot: P06730) con su pareja 4EBP1 (proteína 1 de unión a 4E de factor de inicio de traducción eucariótica; NCBI Gen ID: 1978; UniProtKB/Swiss-Prot: Q13541) y Cap-ON designa el complejo formado por la interacción de la proteína de unión cap eIF4E con su pareja eIF4G (factor 4G de inicio de traducción eucariótica; por ejemplo NCBI Gen ID: 1981; por ejemplo UniProtKB/Swiss-Prot: Q04637). En el contexto de la presente invención, los términos "eIF4E", "eIF4G" y "4EBP1" incluyen cualquier isoforma funcional de dichas proteínas.

5 En un aspecto particular, el método descrito para evaluar o monitorizar la sensibilidad o la resistencia de un sujeto que tiene un tumor frente a un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK y/o de la ruta PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK, comprende de forma ventajosa adicionalmente una etapa de comparación de la ratio Cap-OFF/Cap-ON en la muestra biológica del sujeto con un nivel de referencia de la ratio Cap-OFF/Cap-ON, por ejemplo la ratio en una célula de referencia, típicamente una célula cancerosa, preferiblemente una célula sensible al inhibidor(es) particular(es) usado(s) en el tratamiento. Alternativamente, la ratio de referencia o de control se determina con una muestra de pacientes o sujetos sensibles al tratamiento particular. Obviamente, la ratio Cap-OFF/Cap-ON también puede considerarse como una realización alternativa.

10 Respecto a la ratio Cap-OFF/Cap-ON o Cap-ON/Cap-OFF, el aspecto importante para la presente invención son las cantidades relativas de Cap-OFF y Cap-ON. De este modo, una ratio de eiF4F Cap-OFF/Cap-ON elevada en la presente memoria en particular se refiere a un aumento de la cantidad del complejo de eiF4F Cap-OFF respecto a la cantidad del complejo de eiF4F Cap-ON en comparación con la cantidad relativa de dichos complejos en una célula sensible, y una ratio de eiF4F Cap-OFF/Cap-ON baja en la presente memoria se refiere a una reducción de la cantidad del complejo de eiF4F Cap-OFF respecto a la cantidad del complejo de eiF4F Cap-ON en comparación con la cantidad relativa de dichos complejos en una célula sensible. Sin embargo, el especialista en la técnica comprenderá que se pueden utilizar otras referencias. Por ejemplo, la invención también contempla una referencia correspondiente a una ratio determinada en una célula resistente al tratamiento particular contra el cáncer.

20 En una realización preferida, la ratio Cap-OFF/Cap-ON preferida se determina en el mismo sujeto antes o al inicio del tratamiento con el agente antitumoral. A continuación, si la ratio Cap-OFF/Cap-ON después o durante el tratamiento con un agente antitumoral aumenta en comparación con la ratio pre-tratamiento, entonces el tratamiento con el agente antitumoral es eficaz y el sujeto responde. Alternativamente, si la ratio Cap-OFF/Cap-ON después o durante el tratamiento con el agente antitumoral no aumenta, o disminuye, en comparación con la ratio pre-tratamiento, entonces el tratamiento con el agente antitumoral no es eficaz y el sujeto no responde.

25 En el contexto de los métodos descritos en la presente memoria, la cantidad de los diferentes complejos de eiF4F puede determinarse mediante una serie de métodos. En particular, dicha cantidad puede determinarse usando un método para evaluar el nivel de interacción de proteína, permitiendo el estudio de la cantidad relativa de complejos de proteína activos e inactivos. En particular, dicha cantidad puede determinarse mediante un ensayo de ligación de proximidad (PLA) o un ensayo de unión CAP. En la sección de Ejemplos se proporcionan métodos detallados. Existe un kit para PLA disponible comercialmente (kit DUOLink (OLINK, Uppsala, Suecia).

30 De forma más general, la cantidad de los diferentes complejos de eiF4F se determina a nivel de interacción de proteínas, siendo de este modo claramente distinto de descripciones previas que se han centrado en la expresión de ARN y/o proteína o en el estatus de fosforilación. De hecho, basarse en la expresión de ARN puede conducir a error debido a los potenciales cambios post-traduccionales que se pueden producir, induciendo importantes discrepancias entre la cantidad proporcionada para un ARN dado y la cantidad de la correspondiente proteína. El estudio del nivel de una proteína fosforilada dada también puede conducir a conclusiones falsas, ya que la activación de la maquinaria de traducción es un proceso regulado permanentemente, resultado de los equilibrios entre los complejos activos e inactivos. Una estrategia basada en el estudio de la cantidad relativa de complejos de proteína activos e inactivos es una que debería proporcionar la indicación más precisa e inmediata del estatus de activación/inactivación de los complejos.

40 En la presente memoria también se describe un método *in vitro* o *ex vivo* para evaluar el pronóstico de un cáncer. Dicho método comprende una etapa de determinar, en una muestra biológica del sujeto, la ratio Cap-OFF/Cap-ON del complejo de eiF4F, determinando de este modo el pronóstico del cáncer en el sujeto.

45 Una ratio Cap-OFF/Cap-ON elevada en una muestra biológica de un sujeto, preferiblemente en una muestra tumoral del sujeto, es indicativa de un pronóstico favorable del cáncer en el sujeto. Por el contrario, la ratio Cap-OFF/Cap-ON baja en una muestra biológica de un sujeto, es indicativa de un pronóstico desfavorable del cáncer en el sujeto.

Una ratio de complejo de eiF4F Cap-OFF/Cap-ON baja puede determinar la incapacidad del sujeto para responder de forma positiva a un tratamiento contra el cáncer con un agente antitumoral tal como un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K y/o puede usarse para evaluar el pronóstico de un cáncer en un sujeto.

50 Según la presente invención, una "ratio de complejo de eiF4F Cap-OFF/Cap-ON alta" es una ratio superior a 0,6, en particular superior a 0,7, en particular superior a 0,8, en particular superior a 0,9, en particular superior a 1. Inversamente, una "ratio de complejo de eiF4F Cap-OFF/Cap-ON baja" es una ratio inferior a 1, en particular inferior a 0,9, en particular inferior a 0,8, en particular inferior a 0,7, en particular inferior a 0,6.

55 El agente antitumoral puede ser cualquier agente adecuado para tratar un tumor. Incluye los agentes que dañan ADN, los inhibidores de la ruta MPAK, los inhibidores de la ruta PI3K, los inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), los inhibidores de tirosina o serina/treonina quinasa, la terapia hormonal (p.ej., Tamoxifen, Toremifeno, Anastrozol, Exemestano, Letrozol, Goserelina/Leuprolide, acetato de Megestrol y Fluoximesterona), la inmunoterapia, inhibidores de un factor de crecimiento o de una señalización de factor de crecimiento tal como VEGF o señalización de VEGF, o una combinación de los mismos.

El agente antitumoral que daña ADN puede seleccionarse en particular del grupo que consiste en inhibidores de topoisomerasas I y/o II, reticuladores de ADN, agentes alquilantes de ADN y agentes anti-metabólicos. En una realización preferida, el agente antitumoral que daña ADN se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de topoisomerasas I y/o II, y reticuladores de ADN.

- 5 Preferiblemente, el agente antitumoral es un inhibidor de la ruta MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) o de la ruta PI3K (fosfoinositida 3-quinasa), o una combinación de las mismas.

En una primera realización preferida, el agente antitumoral es un inhibidor de la ruta MAPK. Dichos inhibidores de la ruta MAPK incluyen inhibidores de RAF, en particular BRAF, de MEK1/2 (proteína quinasa activada por mitógeno, también conocida como MAP2K) de ERK y de MNK. Preferiblemente, incluye inhibidores de BRAF, inhibidores de MEK e inhibidores de MNK. Por ejemplo, dichos inhibidores de ruta MAPK, que incluyen inhibidores de MEK y de RAF, pueden seleccionarse entre los inhibidores conocidos por el especialista en la técnica y por tanto pueden seleccionarse por ejemplo: i) inhibidores de MEK: selumetinib, trametinib, AZD6244, R04987655, R05126766, TAK-733, MSC1936369B (AS703026), BAY86-9766, GDC-0973, GDC-0623, PD325901, ARRY-438162, CM 040, E6201, ARRY300; ii) inhibidores selectivos de RAF y/o BRAF: PLX-4720, Sorafenib (BAY-43-9006), vemurafenib, dabrafenib, LGX818, BMS-908662 (XL-281), RAF265, RG-7256 (RO5212054, PLX3603), R05126766, ARQ-736, E-3810, DCC-2036; iii) inhibidores de MNK: CGP 57380, CGP 052088, Cercosporamida (Hou et al., 2012). En una realización preferida, el inhibidor de la ruta MAPK se selecciona del grupo que consiste en sorafenib, PLX-4720, vemurafenib, dabrafenib, LGX818, PD0325901, selumetinib, GDC0973, trametinib y CGP 57380.

En una segunda realización preferida, el agente antitumoral es un inhibidor de la ruta PI3K. Por inhibidor de la ruta PI3K se pretende indicar un inhibidor que actúa sobre la ruta PI3quinasa/AKT/mTOR. En particular, el inhibidor de PI3K también puede ser un inhibidor de mTOR, o un inhibidor de Akt. Por ejemplo, el inhibidor de PI3K puede seleccionarse del grupo que consiste en NVP-BE235, DC-0941, BGT226, GSK1059615, CAL-101 (GS1101), PX-866, SF1126, INK1117, IPI-145, GDC-0941, BKM120, AMG319, XL147, XL765, Palomid 529, GSK1059615 o GSK615, ZSTK474, PWT33597, TG100-115, CAL263, PI-103, CHR-4432, Archexin, SAR245408, SAR245409, BMK120, GSK2126458, BAY 80-6946, tandutinib, GSK690693, MK-2206, triciribina, PKI-587, BYL719, GDC-0032, PX-478 y GDC-0980.

En otra realización, el agente antitumoral es un inhibidor de un factor de crecimiento o de una señalización de factor de crecimiento. Por ejemplo, el inhibidor de un factor de crecimiento o de una señalización de factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de VEGF tal como bevacizumab, o de una señalización de VEGF tal como un inhibidor del VEGFR (p.ej., sunitinib, sorafenib o regorafenib) y de otros factores de crecimiento o señalizaciones de factor de crecimiento. Por ejemplo, el inhibidor de un factor de crecimiento o de una señalización de factor de crecimiento es un inhibidor de EGF o de señalización de EGF tal como un inhibidor del EGFR (p.ej., erlotinib o cetuximab). Otros inhibidores de señalización de factor de crecimiento incluyen inhibidores de kit tales como imatinib o sunitinib.

En la presente memoria también se describe un kit para evaluar o monitorizar la sensibilidad o la resistencia de un sujeto que tiene un tumor frente a un tratamiento contra el cáncer, en particular un tratamiento con un inhibidor de la ruta MAPK, o el pronóstico de un cáncer en un sujeto, donde el kit comprende (i) los medios para evaluar la cantidad de los complejos de eIF4F Cap-OFF y Cap-ON, tal como los medios para implementar un ensayo de ligación de proximidad (PLA) o un ensayo de unión CAP y, opcionalmente, (ii) un panfleto que proporciona el valor cuantitativo de la ratio de control correspondiente a la ratio de una población de control que puede ser una población de control sensible o una población de control resistente. El kit puede comprender además reactivos de control y otros reactivos necesarios.

La presente invención también se refiere al uso de un ensayo de ligación de proximidad (PLA) o de un kit de la invención para preparar un kit para (i) determinar predictivamente si un sujeto que tiene el tumor responderá a un tratamiento contra el cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK, o si será resistente a dicho tratamiento, y/o para (ii) evaluar el pronóstico de un cáncer en un sujeto que tiene un tumor.

Si el sujeto es identificado, usando un método según la presente invención, como resistente frente a un tratamiento particular contra el cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK, el método comprende de forma ventajosa adicionalmente una etapa de seleccionar una "molécula compensatoria", para usar sola o en combinación con dicho agente antitumoral, como tratamiento terapéutico apropiado contra el cáncer en el sujeto.

Por tanto, en la presente memoria se describe adicionalmente un método para seleccionar un tratamiento terapéutico apropiado, preferiblemente óptimo, contra el cáncer en un sujeto que tiene un tumor, así como moléculas compensatorias para su uso en dicho tratamiento contra el cáncer, en un sujeto identificado, usando un método como el descrito en la presente memoria, como resistente para el tratamiento convencional contra el cáncer.

Los inventores han demostrado que actuar sobre el inicio de la traducción puede ofrecer una estrategia para superar la resistencia a agentes antitumorales tales como agentes anti-BRAF y anti-MEK. Por lo tanto, la presente invención

también se refiere al uso de un compuesto que inhibe el inicio de la traducción para superar la resistencia de una célula cancerosa a un agente antitumoral. En particular, la invención se refiere al uso de un compuesto que inhibe la traducción dependiente de cap actuando sobre eIF4A e inhibiéndolo.

5 Cuando un paciente permanece con una baja ratio Cap-OFF/Cap-ON o aumenta su ratio Cap-OFF/Cap-ON durante la terapia, lo que significa una ausencia de respuesta al tratamiento, se puede proponer una combinación de un inhibidor de la ruta MAPK y un inhibidor de la ruta PI3K. Alternativamente, se puede combinar con el agente antitumoral un inhibidor del complejo de eIF4F, tal como silvestrol y análogos, pateamina A, hippuristanol, ribavirina o 4E-ASO, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K o un inhibidor de un factor de crecimiento o de una señalización de factor de crecimiento, más preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK. En una realización específica, la presente
10 invención se refiere a una combinación de hippuristanol o silvestrol o un análogo de los mismos con un inhibidor de BRAF o con una combinación de inhibidor de BRAF e inhibidores de MEK1/2. El silvestrol y sus análogos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos de patente WO13016658, WO12066002 y WO10060891.

15 Además, en la presente memoria se describe el uso de una molécula compensatoria como la descrita en la presente memoria para mejorar el tratamiento de un cáncer, preferiblemente para tratar el cáncer, o para preparar una composición farmacéutica para mejorar el tratamiento de un cáncer, preferiblemente para tratar el cáncer en un sujeto evaluado e identificado, mediante un método como el descrito en la presente memoria, como resistente a un tratamiento contra el cáncer con un agente antitumoral, en particular un inhibidor de la ruta MAPK o la ruta PI3K o un inhibidor de un factor de crecimiento de una señalización de factor de crecimiento tal como VEGF o la señalización de
20 VEGF, preferiblemente de la ruta MAPK, en particular a un inhibidor de BRAF o MEK. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende adicionalmente, como preparación combinada, otro fármaco usado en un tratamiento contra el cáncer, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de dicho cáncer.

25 Adicionalmente, en la presente memoria se describe un método para prevenir o tratar un cáncer que comprende la administración a un sujeto que lo necesite, como se ha explicado previamente, de una molécula o compuesto compensatorio, preferiblemente junto con (en combinación con) un agente terapéutico distinto, siendo administrada la molécula y el agente terapéutico distinto simultáneamente o de forma separada en el contexto de un único protocolo contra el cáncer.

30 También se describe en la presente memoria un método para cribar o identificar un compuesto adecuado para mejorar el tratamiento de un cáncer (identificado en la presente memoria también como "molécula compensatoria") en un sujeto que tiene un tumor, en particular como se ha indicado anteriormente un melanoma, comprendiendo dicho método la determinación de la capacidad de un compuesto de ensayo (i) para modificar la ratio Cap-OFF/Cap-ON del complejo de eIF4F. De este modo, se podrían identificar las moléculas compensatorias que mejoran el tratamiento de un cáncer, o que reducen el desarrollo de una resistencia durante dicho tratamiento de un cáncer.

35 En otro aspecto particular, el método comprende: 1) proporcionar una célula o línea celular sensible o resistente a un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente de la ruta MAPK; 2) poner en contacto dicha célula o línea celular con un compuesto de ensayo; 3) determinar la cantidad de las formas Cap-OFF y Cap-ON del complejo de eIF4F, y, 4) seleccionar el compuesto que aumenta la ratio Cap-OFF/Cap-ON en dicha célula o línea celular.

40 Los compuestos identificados con uno de los métodos de cribado descritos en la presente memoria pueden usarse, en el contexto de la presente invención, como moléculas compensatorias.

Adicionalmente, el compuesto identificado con los métodos de cribado de la invención puede usarse para sensibilizar al paciente frente a un tratamiento contra el cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente de la ruta MAPK.

45 Por consiguiente, la invención también se refiere a un método para sensibilizar a un sujeto frente a un tratamiento contra un cáncer con un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente de la ruta MAPK, que comprende administrar a dicho sujeto un compuesto que aumenta la ratio Cap-OFF/Cap-ON del complejo eIF4F.

50 En una realización particular, la presente invención se refiere al uso de un compuesto que aumenta la cantidad del complejo de eIF4F Cap-OFF con respecto a la de complejo de eIF4F Cap-ON, para sensibilizar a un sujeto que lo necesite frente a un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente de la ruta MAPK. En particular, el compuesto se usa para sensibilizar al sujeto frente a un inhibidor de BRAF y/o de MEK, como se ha descrito anteriormente.

55 Más particularmente, la invención también se refiere a un tratamiento de combinación contra el cáncer que comprende un compuesto que aumenta la ratio Cap-OFF/Cap-ON del complejo de eIF4F en un tumor o célula tumoral y un agente antitumoral, preferiblemente un inhibidor de la ruta MAPK o PI3K, más preferiblemente de la ruta MAPK, y más particularmente un inhibidor de BRAF y/o un inhibidor de MEK, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de dicho cáncer. Por ejemplo, se podrían usar inhibidores del complejo de eIF4F tales como hippuristanol

o silvestrol y análogos de los mismos, como se ha descrito anteriormente, en combinación con un inhibidor de BRAF, como se ha descrito anteriormente.

En la siguiente sección experimental se proporcionan otras características y ventajas de la invención, haciendo referencia a las figuras, que deberían considerarse como ilustrativas y no como limitativas del alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Materiales y métodos

Proliferación celular

10 La proliferación celular se midió usando un reactivo WST-1 (Roche Applied Science, IN, EE.UU.). Las células de melanoma se colocaron en placa con 5000 células por pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con los fármacos o DMSO a las concentraciones indicadas, por triplicado. Se añadió el reactivo WST-1 a los pocillos y se incubó a 37°C durante 2 horas antes y después del periodo de tratamiento de 48 horas. A continuación, las placas fueron leídas a 450 nm en un contador Wallac Victor³ 1420 Multilabel (Perkin Elmer, ON, Canadá). Las lecturas de absorbancia se expresan en términos de proliferación celular como porcentaje de las células de control crecidas en las 48 horas de tratamiento.

Ensayos clonogénicos

20 Las células fueron llevadas a placa con una baja densidad (1×10^3 células por pocillo en una placa de cultivo de tejido de 6 pocillos) en medio fresco. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con fármaco o DMSO a las concentraciones indicadas, por duplicado. Después de 9-14 días, las células fueron teñidas con cristal violeta al 0,5% (p/v) en etanol al 70% y se contabilizó el número de colonias.

Ensayo de unión Cap

25 Las células fueron crecidas durante 48 h en suero bovino fetal (FBS) al 10% seguido de 24 h sin FBS. A continuación, las células fueron crecidas durante 12 h en ausencia o en presencia de trastuzumab. Las células fueron recolectadas y lisadas en tampón de lisis enfriado en hielo (KCl 150 mM, Hepes pH 7,5 50 mM, DTT 2 mM, Tween 20 al 0,2%, y Cóctel Inhibidor de Proteasas Completo de Roche). Los lisatos celulares fueron incubados con perlas de 7-metil-GTP-sefarosa 4B (Amersham Biosciences) durante 2 h a 4°C. Los eluatos de las perlas (ligado a 7mG) y los extractos totales (Tot.) fueron analizados con electroforesis de gel de gradiente 4-12% seguido de análisis de transferencia western. Los experimentos se repitieron al menos 4 veces.

30 Ensayos de ligación de proximidad

Los ensayos de ligación de proximidad (PLAs) se llevaron a cabo en líneas celulares transfectadas tanto fijas como permeabilizadas en portas de cámara y portas TMA que contenían tejido de melanoma. Tras desecar y rehidratar las secciones de tejido, se llevó a cabo la recuperación de antígeno calentando los portas durante 30 minutos a 95°C en tampón TE, pH 9. A partir de ese momento, las secciones de TMA y las líneas celulares fueron tratadas de forma idéntica y se siguió el protocolo PLA según las instrucciones de los fabricantes (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia), con incubación de los anticuerpos primarios a 4°C durante una noche. Tras bloquear (OLINK), los anticuerpos se usaron a las siguientes concentraciones: para eIF4E (ratón, clone A-10, SC-271480, Santa Cruz 1:200); para eIF4G (conejo, 2498; Cell Signaling 1:200); para 4EBP1 (conejo, clon 53H11; 9644; Cell Signaling 1:200). Se añadió al ensayo de ligación de proximidad sondas PLA menos y PLA más (que contenían los anticuerpos secundarios conjugados con oligonucleótidos) y se incubaron 1 h a 37°C. Después de eso, se añadieron oligonucleótidos adicionales, se dejó que se hibridaran con las sondas PLA, y se usó ligasa para unir los dos oligonucleótidos hibridados en un círculo cerrado. A continuación, se amplificó el ADN (amplificación de círculo giratorio), y se llevó a cabo la detección de los amplicones usando el "kit de detección Brightfield" para la revelación cromogénica o usando el "kit de detección far Red" para la revelación de fluorescencia. Las secciones se montaron con medio de montaje Olink. Se contabilizó el número de señales PLA por célula *in situ* mediante análisis de imágenes semi-automatizado.

Resultados

50 Para investigar si la interacción entre eIF4E y sus compañeros eIF4G o 4EBP1 puede ligarse a la resistencia del melanoma frente a inhibidores anti-BRAF, los inventores evaluaron un panel de líneas celulares de melanoma mutadas en BRAF (V600E) disponibles comercialmente para determinar su respuesta a N-[3-[(5-cloro-1H-pirrolol[2,3-b]piridin-3-il)carbonil]-2,4-difluorofenil]-1-propanosulfonamida (o PLX-4720; disponible comercialmente en Selleckchem). Identificaron dos líneas celulares (Mel624 y A2058) que son menos sensibles a PLX-4720 que toras líneas celulares de melanoma mutadas en BRAF (V600E) en ensayos de proliferación tanto a corto plazo (Fig. 1A) como a largo plazo (Fig. 1B).

Los inventores cuantificaron el efecto de exponer dichas líneas celulares a PLX-4720 en la concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) (Tabla 1).

Tabla 1:

<u>Línea celular</u>	<u>PLX-4720 (μM)</u>
A375	0,4
Mel888	0,1
SK-Mel28	0,4
Mel624	4,4
A2058	2,4
SK-Mel5	1,5
Mel10	>10

5 Para determinar los mecanismos moleculares subyacentes en las diferencias de sensibilidad frente al PLX-4720 en dichas líneas celulares, los inventores evaluaron lisatos de células tratadas con PLX-4720 con anticuerpos específicos de fosfoproteína que identifican los estados activados de la ruta MAPK (ERK) y de la ruta PI3K-Akt-mTOR. El tratamiento con PLX-4720 inhibió la fosforilación de ERK aguas debajo de BRAF de un modo bastante similar en todas las líneas celulares evaluadas (Fig. 2), demostrando que la sensibilidad diferencial al PLX-4720 no puede explicarse por una reactivación de la ruta MAPK. Además, los inventores no encontraron un efecto diferencial sobre la fosforilación de mTOR, lo que demuestra que la diferencia en la sensibilidad no se debía a una activación de la ruta paralela PI3K-Akt-mTOR.

10 Estos datos condujeron a los inventores a examinar la formación del complejo de eIF4F en este panel de líneas celulares. En un ensayo denominado "ensayo de unión cap", se usaron perlas sintéticas de m7GTP-Sefarosa para capturar eIF4E y sus compañeros de unión, eIF4G (denominado complejo Cap-ON) y 4EBP1 (denominado complejo Cap-OFF). Los inventores observaron que después del tratamiento con PLX-4720, aumentó la cantidad de 4EBP1 ligada a eIF4E (complejo Cap-OFF), mientras que la cantidad de eIF4G ligada a eIF4E (complejo Cap-ON), es decir, la formación del complejo de eIF4F activo, disminuyó en las dos líneas celulares sensibles a PLX-4720 (A375, Mel888) (Fig. 3). Por el contrario, y en consistencia con la hipótesis de los inventores, la formación del complejo de eIF4F no se vio alterada en las dos líneas celulares con menos sensibilidad al PLX-4720 (Mel624, A2058).

15 Para confirmar estos datos con otro ensayo que también podría ser más apropiado para evaluar la formación de complejo de eIF4F en muestras tumorales, los inventores aprovecharon el procedimiento del "Ensayo de ligación de proximidad" (PLA). El PLA permite la detección de la distribución celular de proteínas endógenas a nivel de molécula individual. Se usan anticuerpos alterados para detectar complejos proteínicos *in situ* en tejidos, y se pueden usar para evaluar la homo/heterodimerización y las interacciones proteína-proteína. Hasta donde conocen los inventores, el PLA no se ha usado nunca para examinar la formación de eIF4F. Por lo tanto, han preparado este ensayo para permitir la detección tanto de la interacción eIF4E-eIF4G (complejo Cap-ON, ya que está relacionado con la formación del complejo de eIF4F activo) como el complejo eIF4E-4EBP1 (complejo Cap-OFF, ya que está relacionado con el reclutamiento de eIF4E en un complejo de traducción reprimido).

20 Los inventores confirmaron el procedimiento de base bioquímica "ensayo de unión cap" con el procedimiento basado en PLA. De hecho, las líneas celulares sensibles a PLX-4720 (A375, Mel888) mostraron recuentos de señal reducidos para la interacción eIF4E-eIF4G ("Cap-ON") en la condición tratada con PLX-4720 en comparación con la condición sin tratar (Fig. 4). En paralelo, observamos un aumento dependiente de PLX-4720 en la interacción eIF4E-4EBP1 "Cap-OFF" en las mismas dos líneas celulares. El PLX-4720 no afectó a la interacción "Cap-ON" y "Cap-OFF" en las líneas celulares menos sensibles a PLX-4720 (Mel624, A2058) (Fig. 4), lo que nuevamente demuestra que, al contrario que las líneas celulares sensibles a PLX-4720, el PLX-4720 no fue capaz de alterar la formación del eIF4F en las líneas celulares menos sensibles.

25 Los datos presentados en la Fig. 3 y la Fig. 4 llevaron a los inventores a concluir que la sensibilidad diferencial frente a la diana anti-BRAF estaba asociada a la formación del complejo de eIF4F activo. Para demostrar que la formación del complejo de eIF4F está implicada en la sensibilidad diferencial de las líneas celulares estudiadas, los inventores aprovecharon el compuesto 4EGi-1 que fue identificado tras un cribado de unión de polarización de fluorescencia de alta capacidad, para inhibir la interacción entre eIF4E y eIF4G. 4EGi-1 se une a eIF4E y con ellos altera la interacción eIF4E/eIF4G (Moerke, 2007). Los inventores descubrieron que 4EGi-1 de hecho reducía la interacción eIF4E-eIF4G ("Cap-ON") y paralelamente aumentaba la interacción eIF4E-4EBP1 "Cap-OFF" en todas las líneas celulares evaluadas, incluyendo las dos líneas celulares menos sensibles a PLX-4720 (Mel624, A2058) (Fig. 5A y B).
 40 Adicionalmente, los inventores descubrieron que las dos líneas celulares mencionadas son más sensibles a 4EGi-1 que las líneas celulares sensibles a PLX-4720 (Fig. 5C), lo que demuestra que este compuesto presenta potencial para eludir la resistencia relativa a PLX-4720.

Para investigar la formación del complejo de eIF4F en muestras tumorales de pacientes, los inventores aplicaron el procedimiento PLA a muestras fijadas en formalina. Compararon el estatus de activación del estatus de las interacciones “Cap-ON” y “Cap-OFF” en las biopsias secuenciales antes del tratamiento, durante la terapia y en el desarrollo de resistencia a vemurafenib. Encontraron que la ratio de complejos “Cap-ON” a “Cap-OFF” disminuyó durante el tratamiento (Fig. 6A y 6B; Pacientes #1 y #2) y aumentó cuando se produjo resistencia (Fig. 6C; Pacientes #3 a #5).

En global, estos resultados indican que la formación del complejo de inicio de la traducción eIF4F dependiente de cap está ligada a la resistencia a agentes anti-BRAF.

Ejemplo 2

Los inventores han demostrado adicionalmente la relación entre el complejo de inicio de la traducción eIF4F y la resistencia a agentes antitumorales en diferentes cánceres a través de los siguientes experimentos.

Materiales y métodos

Líneas celulares y reactivos

Las líneas celulares de melanoma A375, Mel888, A2058, SK-Mel28 y SK-Mel5 usadas en este estudio fueron adquiridas en la ATCC y las líneas celulares Mel624 y Mel10 fueron un obsequio de G. Lizee, MD Anderson Cancer Center, Houston y L. Zitvogel, Gustave Roussy, respectivamente. La línea celular de cáncer de tiroides BCPAP y la línea celular de cáncer colorrectal HT29 fueron un obsequio de C. Dupuy y S. Chouaib, Gustave Roussy, respectivamente. Las líneas celulares de cáncer fueron mantenidas a 37°C y un 5% de CO₂ en atmósfera humidificada, y crecidas en medio de cultivo RPMI1640, MEM o DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, 50 u/mL de penicilina y 50 mg/mL de estreptomina (GIBCO). Todas las líneas celulares fueron verificadas regularmente para comprobar que estaban libres de micoplasma usando un ensayo basado en PCR (Biovalley, Francia). Las células fueron tratadas con un inhibidor de BRAF (vemurafenib), un inhibidor de MEK (PD0325901), un inhibidor de MNK (CGP 57380), un inhibidor de la interacción eIF4E-eIF4G (4EGi-1). Todos los fármacos fueron disueltos en DMSO para los estudios *in vitro*. El PLX4720 se obtuvo de Plexxikon sin ningún apoyo financiero.

Análisis de proliferación e índice Bliss

La proliferación celular se midió usando un reactivo WST-1 (Roche Applied Science, IN, EE.UU.). Las células de melanoma se colocaron en placa (5000 células por pocillo) en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con los fármacos o DMSO a las concentraciones indicadas, por triplicado. Se añadió el reactivo WST-1 a los pocillos y se incubó a 37°C durante 2 horas antes y después del periodo de tratamiento de 48 horas. A continuación, las placas fueron leídas a 450 nm en un contador Wallac Victor³ 1420 Multilabel (Perkin Elmer, ON, Canadá). La proliferación celular se expresa como porcentaje de la absorbancia en comparación con las células de control.

Para evaluar el efecto del vemurafenib en combinación con otros fármacos, se compararon las respuestas observadas y esperadas obtenidas del tratamiento de combinación. Se usó el modelo de aditividad de Loewe para predecir el efecto combinado de cada fármaco. El efecto esperado (E_{esp}) de la combinación se estimó a partir de cada efecto de fármaco separado:

$$E_{esp} = E_{fármaco1} + E_{fármaco2} - (E_{fármaco1} \cdot E_{fármaco2})$$

La ratio observado/esperado se calculó de acuerdo al método Bliss. En este modelo, el exceso por encima del índice Bliss predicho representa el efecto sinérgico del tratamiento de combinación.

Se trataron células Mel624 durante 48 h antes del ensayo de WST-1 con 4EGi-1 (6 μ M) y dosis variables de vemurafenib que oscilaban entre 25 nM y 12000 nM.

Ensayos clonogénicos

Para los ensayos clonogénicos, las células fueron llevadas a placa con una baja densidad (1x10³ células por pocillo en una placa de cultivo de tejido de 6 pocillos) en medio fresco. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con fármaco o DMSO a las concentraciones indicadas, por duplicado. Después de 14 días fueron teñidas con cristal violeta al 0,5% (p/v) en etanol al 70% y se contabilizó el número de colonias.

Ensayos de ligación de proximidad

Los ensayos de ligación de proximidad (PLAs) se llevaron a cabo en células tanto fijas como permeabilizadas en secciones de tejido de melanoma. Tras desecar y rehidratar las secciones de tejido, se llevó a cabo la recuperación de antígeno calentando los portas durante 30 minutos a 95°C en tampón TE, pH 9. A partir de ese momento, las secciones de tejido y las células fijas/permeabilizadas fueron tratadas de forma idéntica y se siguió el protocolo PLA según las instrucciones de los fabricantes (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia), con incubación de los anticuerpos primarios a 4°C durante una noche. Tras bloquear, los anticuerpos se usaron a las siguientes concentraciones: para

eIF4E (ratón, clon A-10, SC-271480, Santa Cruz 1:200); para eIF4G (conejo, 2498; Cell Signaling 1:200); para 4EBP1 (conejo, clon 53H11; 9644; Cell Signaling 1:200). Se añadieron sondas PLA menos y PLA más (que contenían los anticuerpos secundarios conjugados con oligonucleótidos) y se incubaron 1 h a 37°C. Después de eso, se añadieron oligonucleótidos adicionales, y se dejó que se hibridaran con las sondas PLA. La ligasa unió los dos oligonucleótidos hibridados en un círculo cerrado. A continuación, se amplificó el ADN (amplificación de círculo giratorio), y se lleva a cabo la detección de los amplicones usando el "kit de detección Brightfield" para la revelación cromogénica o usando el "kit de detección far Red" para la revelación de fluorescencia. Las secciones se montaron con medio de montaje Olink. Los primeros resultados se visualizaron mediante microscopía confocal (SPE (leica)) y el análisis se realizó con el software Volocity. Para mejorar la sensibilidad de la detección de la fluorescencia, a continuación usamos un escáner (Olympus VS120) y se contabilizó el número de señales PLA por célula (>3 campos) mediante un análisis semi-automatizado de las imágenes (ImageJ y oLivia).

Estudio de xenoinjerto de ratón

Los animales fueron alojados en condiciones libres de patógeno con alimento y agua *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo según las guías CCAC y fueron aprobados por el comité de ética de la "Plateforme d'évaluation Préclinique" de Gustave Roussy. Se adquirieron ratones nude hembra Balb/c atímicos (nu/nu) de las instalaciones veterinarias de Gustave Roussy. A la edad de 6-8 semanas, se les inyectó subcutáneamente en el costado derecho 5x10⁶ células A375 en 200 µL de PBS, o 5x10⁶ células Mel624 en 200 µL de PBS-50% matrigel (BD Biosciences). Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 100-300 mm³, a los ratones se les suministró una dieta de roedor de control o 90 (dosis baja), 200 (dosis media) o 417 mg/kg (dosis alta) del análogo de vemurafenib PLX4720 (Plexxikon, EE.UU.). El crecimiento del tumor se monitorizó dos veces por semana en dos dimensiones usando un calibre digital. Los volúmenes tumorales fueron calculados con la fórmula del volumen de un elipsoide L x w² x 0,5 (L=Longitud; w=anchura).

Inmunohistoquímica

Las secciones desparafinadas fueron tratadas con disolución de recuperación de antígeno (tampón de citrato, pH 6,0, concentrado 10X, T0050 Diapath, tampón EDTA pH 9,0, concentrado 10X T0100 Diapath). A continuación, las secciones de tejido fueron incubadas con reactivo de bloqueo de peroxidasa (disolución de bloqueo de peroxidasa S2023, Dako) durante 15 min y bloque de proteína (bloque de proteína libre de suero listo para usar X0909 Dako) durante 20 minutos. Se aplicó anticuerpo primario contra ERK1/2 fosforilada (Thr202/Tyr204) (conejo, clon 20G11, 4376, Cell Signaling), y los portas fueron incubados durante una noche a 4°C. Las señales se visualizaron usando anticuerpo secundario conjugado a HRP de conejo (Dako, K4003) y una contratinción de hematoxilina (disolución de hematoxilina de Mayer MHS32).

Resultados

Para profundizar en la investigación del potencial papel de la formación de complejo de eIF4F en la resistencia de melanoma BRAF(V600) frente a compuestos anti-BRAF y anti-MEK, en primer lugar se evaluó un panel de líneas celulares de melanoma (Tabla 2) para determinar su sensibilidad frente al vemurafenib.

			A375	Mel888	SKMEL 28	Mel624	A2058	MEL 10
IC50	Anti-BRAF V600E	Vemurafenib (µM)	0,4	0,1	0,4	2	2,4	>10
	Anti-MEK	PD 0325901 (nM)	10	2	9	96	33	3
	Anti-Mnk	CGP 57380 (µM)	35	25	60	>100	>100	28
	Anti-eIF4F	4EGi-1 (µM)	>100	77	>100	26	50	>100
		Silvestrol (nM)	21	17	3	4	2	46

Dos líneas celulares mutadas BRAF(V600) (Mel624, A2058) fueron resistentes a vemurafenib, en comparación con otras líneas celulares (p.ej., A375, Mel888) tanto en ensayos de proliferación a corto plazo (Fig. 7a) como a largo plazo (Fig. 7b). De forma similar al patrón de sensibilidad observado in vitro, los xenoinjertos de A375 fueron más sensibles a vemurafenib que los xenoinjertos de Mel624 (Fig. 8a). La determinación de la concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) (Fig. 7a, Tabla 2) y los ensayos de proliferación a largo plazo (Fig. 7b) indicaron que estas dos líneas celulares resistentes a vemurafenib (Mel624 y A2058) también fueron menos sensibles a PD0325901, un inhibidor de MEK, y al inhibidor de MNK CGP 57380 (Fig. 7a). Para determinar el estatus del complejo de eIF4F en estas diversas líneas celulares, usamos un ensayo de unión cap donde perlas de m7GTP-Sefarosa sintéticas capturan el eIF4E y sus dos parejas de unión eIF4G o 4EBP1. Observamos que el vemurafenib conducía a un aumento de la cantidad de 4EBP1 ligado a eIF4E y a una reducción concomitante de la cantidad de eIF4G ligada a eIF4E en las dos líneas celulares sensibles (A375, Mel888).

De forma sorprendente, la alteración dependiente de vemurafenib del complejo eIF4E-eIF4G no se observó en las líneas celulares resistentes Mel624 y A2058. Investigamos adicionalmente la formación del complejo de eIF4F usando un procedimiento de ensayo de ligación de proximidad y visualizamos que el vemurafenib de hecho indujo una

reducción de la interacción eIF4E-eIF4G y un aumento de la formación de los complejos eIF4E-4EBP1 en las líneas celulares sensibles a vemurafenib (A375, Mel888) que no se observó en las líneas celulares resistentes (Mel624, A2058) (Fig. 9a). Los experimentos *in vivo* realizados en ratones fueron consistentes con estos descubrimientos, ya que también observamos menos interacciones eIF4E-eIF4G, en comparación con las interacciones eIF4E-4EBP1, en xenoinjertos de A375 tratados con vemurafenib (sensibles) que en xenoinjertos de Mel624 tratados con vemurafenib (resistentes) (Fig. 8b y c).

Finalmente, este paradigma no se limitó a las líneas celulares de melanoma, ya que el mantenimiento del complejo de eIF4F también se observó en la línea celular de cáncer de colon HT29, en la cual la resistencia se asocia a una mutación PI3K(P449T) activante (Oikonomou et al., 2011) y una sobreexpresión de EGFR (Prahallad et al., 2012), así como en la línea celular de cáncer de tiroides papilar BCPAP, donde la resistencia está ligada a la sobreexpresión de HER3 (Montero-Conde et al., 2013) (Fig. 9b).

Las líneas celulares resistentes a vemurafenib fueron más sensibles a 4EGI-1 que las líneas celulares sensibles a vemurafenib (Fig. 10a), lo que sugiere un papel directo del complejo de eIF4F en sus propiedades de proliferación. Para examinar si la resistencia podría ser revertida alterando el complejo de eIF4F, exploramos el efecto de la combinación de vemurafenib y 4EGI-1 sobre Mel624 y observamos un claro efecto sinérgico (Fig. 10b). Por tanto, la formación del complejo de eIF4F está implicada directamente en la sensibilidad frente al vemurafenib. Por tanto, actuar sobre el inicio de la traducción puede ofrecer una estrategia para superar la resistencia a compuestos anti-BRAF/anti-MEK. Con el fin de evaluar la relevancia clínica del complejo de eIF4F en los pacientes, investigamos su presencia en dieciséis especímenes de biopsia (antes y durante la terapia anti-BRAF) de siete pacientes con melanoma metastásico. Observamos una disminución en la formación del complejo de eIF4F (medida a través de la ratio del complejo eIF4E/eIF4G en comparación con el complejo eIF4E/4EBP1) en tres de cuatro muestras de biopsia de tumores que responden (Fig. 11) en comparación con muestras de biopsia tomadas antes de la terapia (línea base). Por el contrario, en todos los tumores resistentes que progresan durante la terapia, observamos un claro aumento de la formación de complejo de eIF4F, en comparación con las muestras de biopsia de línea base (Fig. 11). De forma interesante, el paciente #4 presentó dos metástasis con una respuesta disociada de manera temprana al tratamiento de vemurafenib, una metástasis que respondía a tratamiento (M1) y otra que fue resistente al tratamiento (M2). Aunque se observó un aumento de eIF4F en la metástasis M2 resistente, no se observó ningún cambio en la metástasis M1 que sí respondió (Fig. 11b). Por tanto, se observó una correlación directa entre la respuesta al tratamiento y la formación de eIF4F, que ilustra la relación *in vivo* entre sensibilidad a la terapia anti-BRAF e inhibición del complejo de inicio de la traducción de eIF4F. Observamos que el aumento de la formación de complejo de eIF4F está asociada de forma más significativa a la resistencia que el nivel de fosforilación de ERK que es investigado convencionalmente para explorar la resistencia (Fig. 11b). Esto confirmó nuestros datos *in vitro*, que mostraron que la formación del complejo de eIF4F estaba asociada a la resistencia a vemurafenib en mecanismos de resistencia tanto dependientes de ERK como independientes de ERK. En conjunto, nuestros datos indican que la formación del complejo de eIF4F podría ser un biomarcador de resistencia más fiable que la fosforilación de ERK.

Se están describiendo un número creciente de mecanismos de resistencia a compuestos anti-BRAF y/o anti-MEK (Lito et al., 2013; Shi et al., 2013; Tentori et al., 2013). Aquí, se identifica la formación del complejo de eIF4F como único nexo de convergencia de múltiples lesiones moleculares que conducen a resistencia a fármaco. Nuestros datos sugieren fuertemente que el eIF4F es una diana terapéutica crítica localizada estratégicamente aguas abajo de las principales cascadas de señalización celular.

Referencias

Blagden SP, Willis AE. The biological and therapeutic relevance of mRNA translation in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 280-91.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 30 de junio de 2011; 364(26): 2507-16.

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 26 de Agosto de 2010; 363(9): 809-19.

Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris HA 3^o, Falchook G, Algazi A, Lewis K, Long GV, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim KB, Patel K, Weber J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*. Noviembre de 2012; 367(18): 1694-703.

Fedorenko IV, Paraiso KH, Smalley KS. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol*. 1 de Agosto de 2011; 82(3): 201-9.

Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH Jr, Kaempgen E, Martín-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martín AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert

- ME, Goodman V, Chapman PB. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 28 de julio de 2012; 380(9839): 358-65.
- Hou J, Lam F, Proud C, Wang S. Targeting Mnk3 for cancer therapy. *Oncotarget*. Febrero de 2012; 3(2): 118-131.
- 5 Lito, P., Rosen, N. & Solit, D. B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature medicine* 19, 1401-1409, doi:10.1038/nm.3392 (2013).
- Moerke NJ, Aktas H, Chen H, Cantel S, Reibarkh MY, Fahmy A, Gross JD, Degterev A, Yuan J, Choev M, Halperin JA, Wagner G. Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell*. 26 de enero de 2007; 128(2): 257-67.
- 10 Montero-Conde, C. et al. Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. *Cancer discovery* 3, 520-533, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0531 (2013).
- Oikonomou, E., Koc, M., Sourkova, V., Andera, L. & Pintzas, A. Selective BRAFV600E inhibitor PLX4720, requires TRAIL assistance to overcome oncogenic PIK3CA resistance. *PloS one* 6, e21632, doi:10.1371/journal.pone.0021632 (2011).
- 15 Prahallad, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483, 100-103, doi:10.1038/nature10868 (2012).
- Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Ogino S, Wargo JA, Golub TR. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 26 de julio de 2012; 487(7408): 500-4.
- 20 Tentori, L., Lacial, P. M. & Graziani, G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends in pharmacological sciences*, doi:10.1016/j.tips.2013.10.003 (2013).
- Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*. 26 de julio de 2012; 487(7408): 505-9.
- 25 Zindy P *et al.* "Formation of the eIF4F Translation-Initiation Complex Determines Sensitivity to Anticancer Drugs Targeting the EGFR and HER2 Receptors", *Cancer Research* 2011; 71(12): 4068-4073.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la sensibilidad o la resistencia de un tumor frente a un agente antitumoral, que comprende evaluar la cantidad de complejo eiF4E-eiF4G (complejo Cap-ON) y la cantidad de complejo eiF4E-4EBP (complejo Cap-OFF) en dicho tumor o en células tumorales derivadas del mismo, y correlacionar la cantidad relativa del complejo Cap-OFF respecto al complejo Cap-ON con la sensibilidad o la resistencia frente al agente antitumoral.
5
2. El método según la reivindicación 1, en donde el tumor es un melanoma, en particular un melanoma con metástasis, un cáncer renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama o un cáncer de pulmón.
3. El método según la reivindicación 2, donde el tumor es un melanoma con metástasis que alberga una mutación en BRAF, en particular la mutación BRAF V600E.
- 10 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente antitumoral se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de BRAF, inhibidores de MEK1/2 (o MAPK), inhibidores de mTOR o Akt, inhibidores de VEGFR e inhibidores de EGFR.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente antitumoral es un inhibidor de BRAF seleccionado del grupo que consiste en sorafenib, PLX-4720 y LGX818.
- 15 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente antitumoral es un inhibidor de MEK seleccionado del grupo que consiste en PD0325901, selumetinib y GDC0973.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la evaluación de la cantidad de los complejos Cap-ON y Cap-OFF comprende el uso de un ensayo de ligación de proximidad (PLA) o de un ensayo de unión CAP.
- 20 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el método comprende además una etapa de comparación de la cantidad relativa de los complejos Cap-OFF y Cap-ON en el tumor con un nivel de referencia.
9. Un método para seleccionar un tratamiento apropiado de un cáncer para un sujeto que tiene un tumor, método que comprende una etapa de determinación de la cantidad de las formas Cap-OFF y Cap-ON del complejo de eiF4F en una muestra biológica de dicho sujeto, siendo una ratio Cap-OFF/Cap-ON elevada en la muestra biológica la indicación de que un tratamiento con un agente antitumoral será eficaz en el sujeto, siendo una ratio Cap-OFF/Cap-ON baja en la muestra biológica la indicación de que un tratamiento con un agente antitumoral no será eficaz en el sujeto.
25
10. Un método para cribar o identificar un compuesto adecuado para mejorar el tratamiento de un cáncer con un agente antitumoral en un sujeto que tiene un tumor, comprendiendo dicho método la determinación de la capacidad de un compuesto de ensayo para aumentar la ratio Cap-OFF/Cap-ON de complejo de eiF4F.

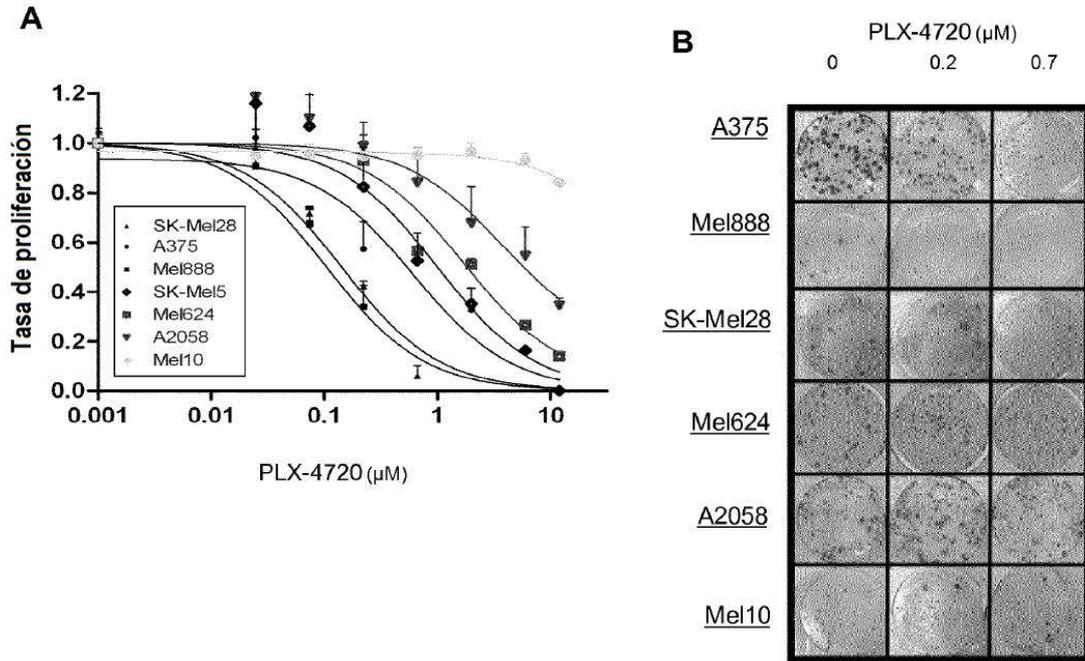


FIGURA 1

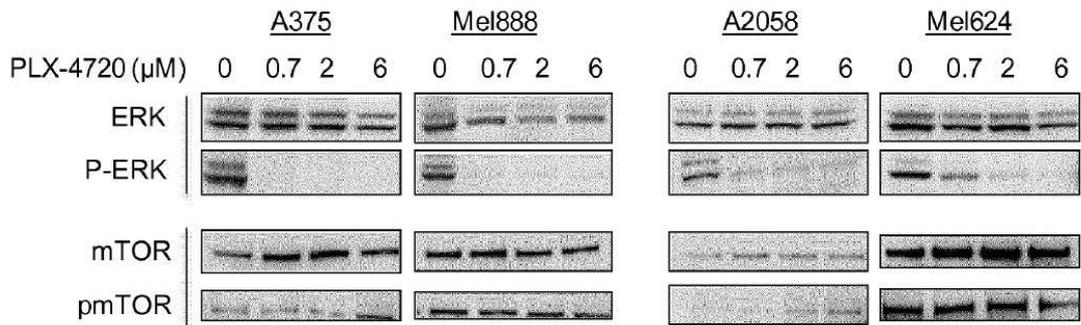


FIGURA 2

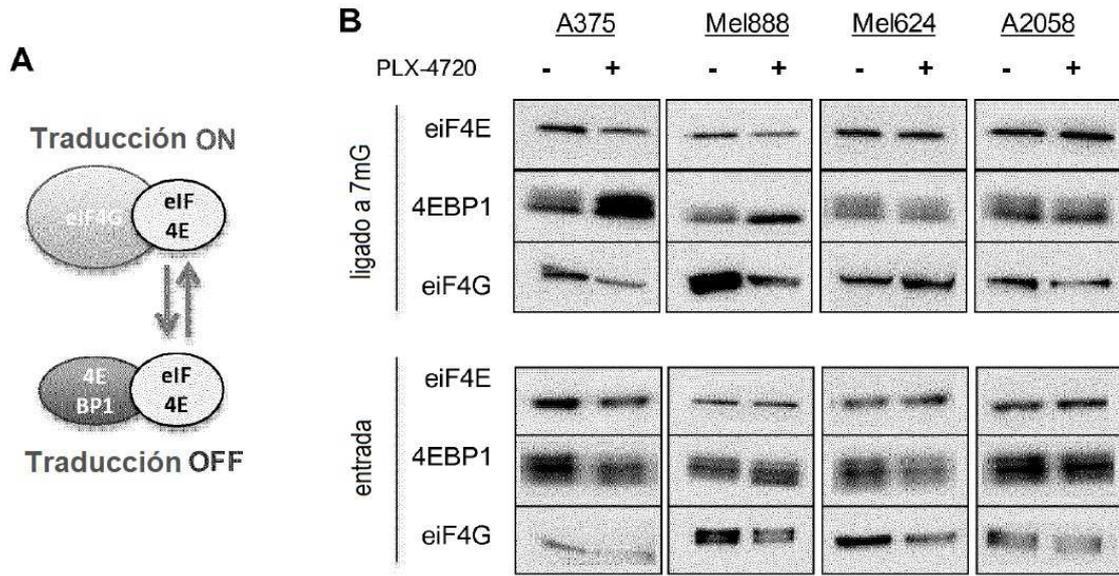


FIGURA 3

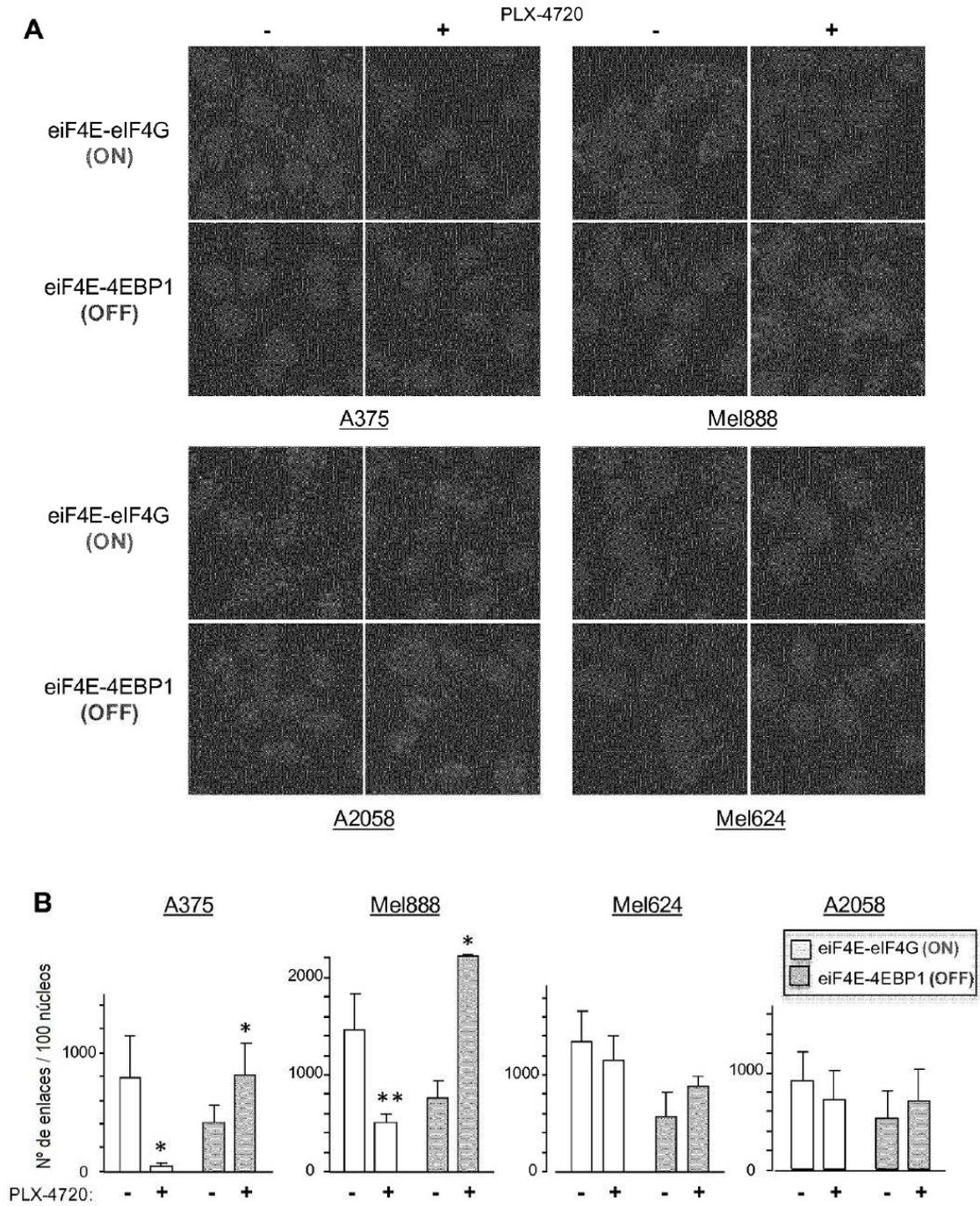


FIGURA 4

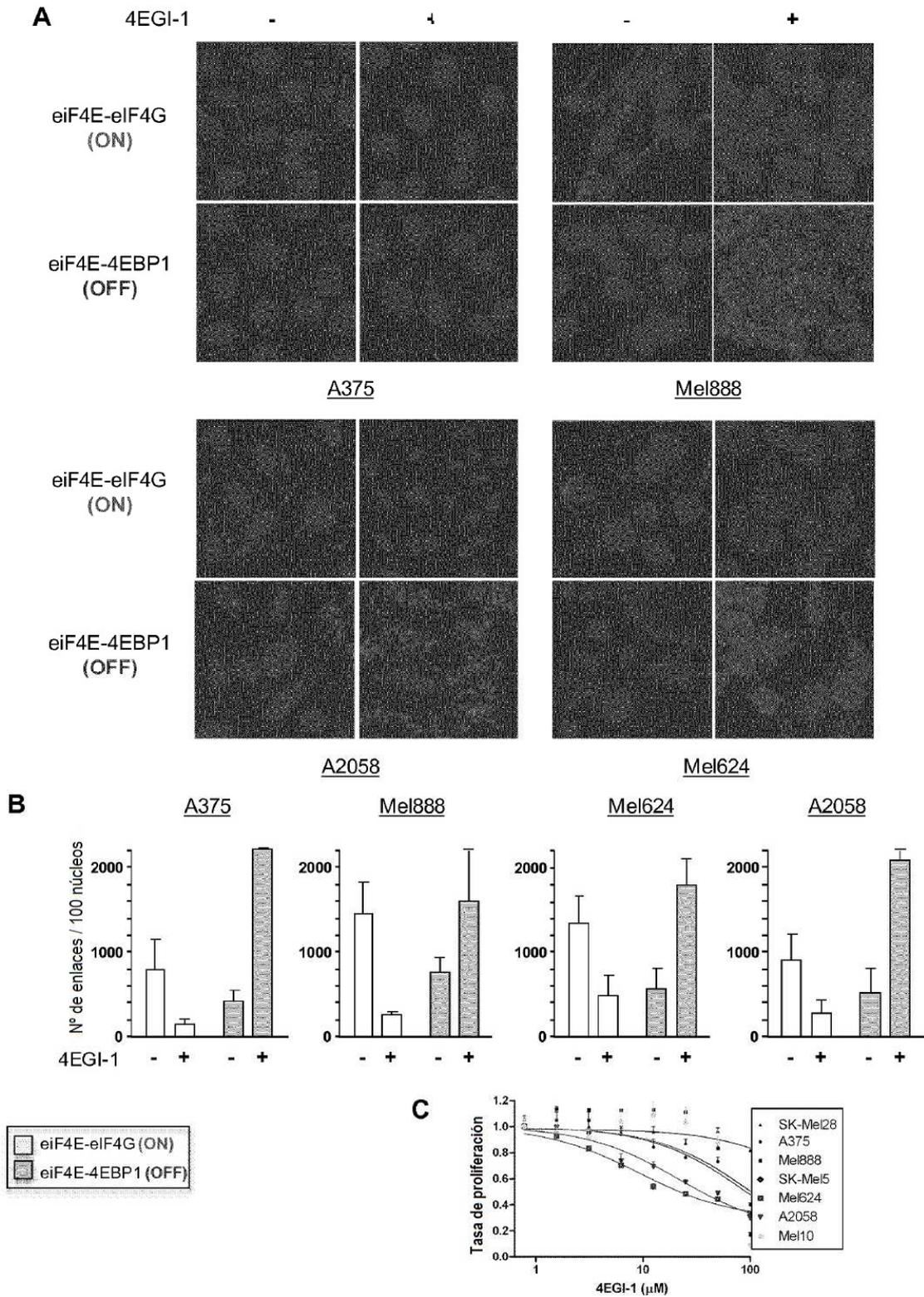


FIGURA 5

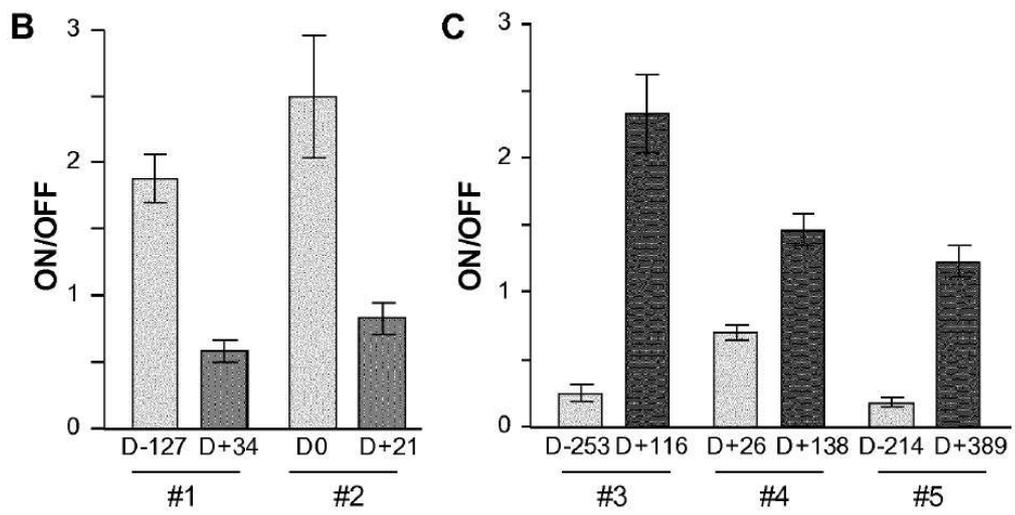
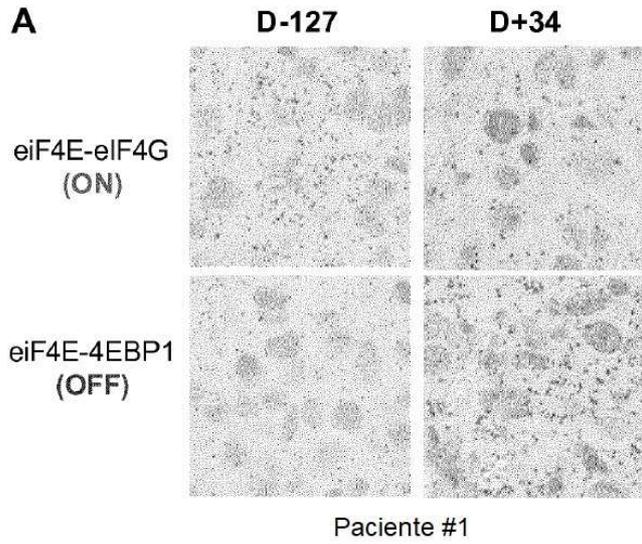


FIGURA 6

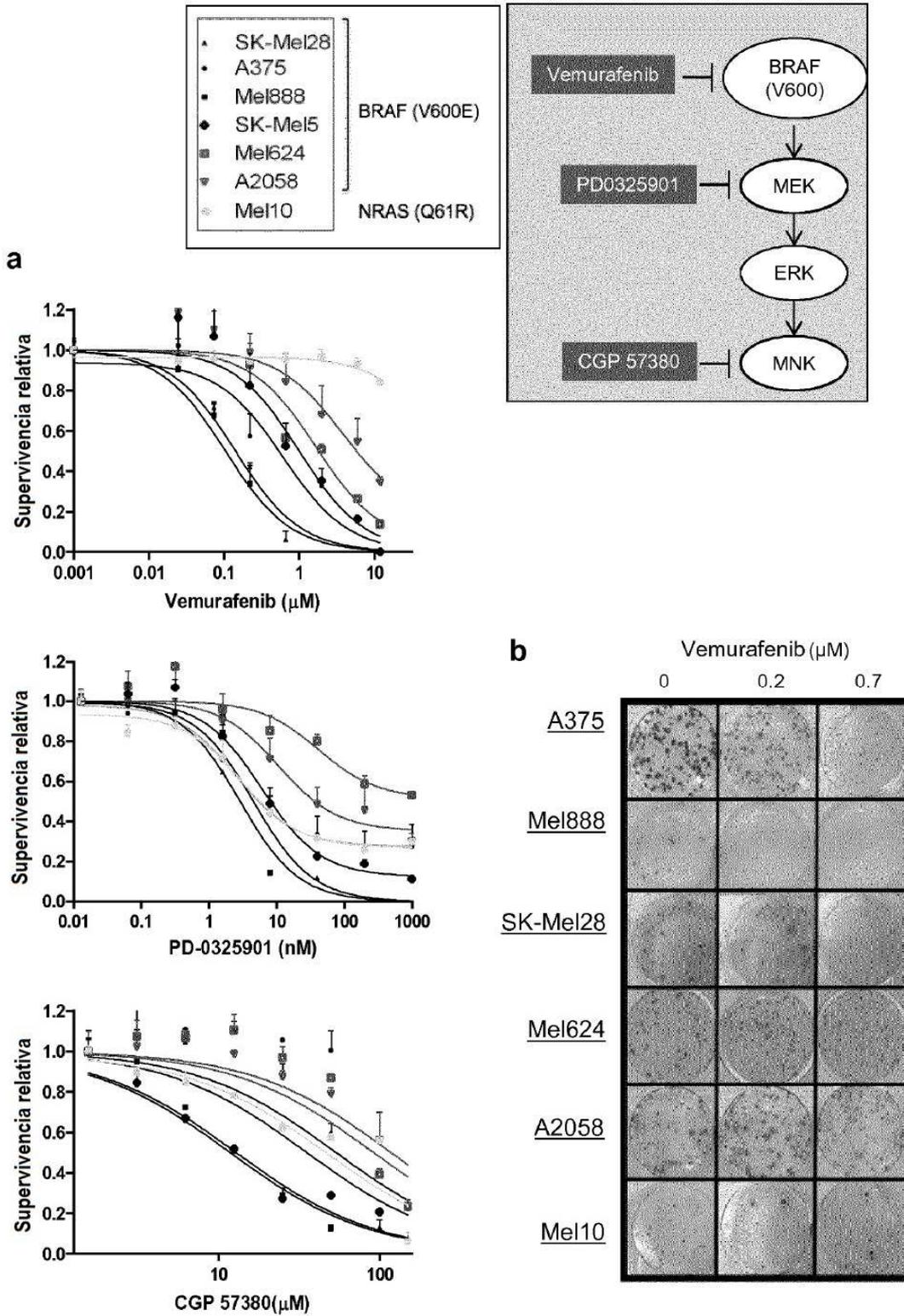


Figura 7

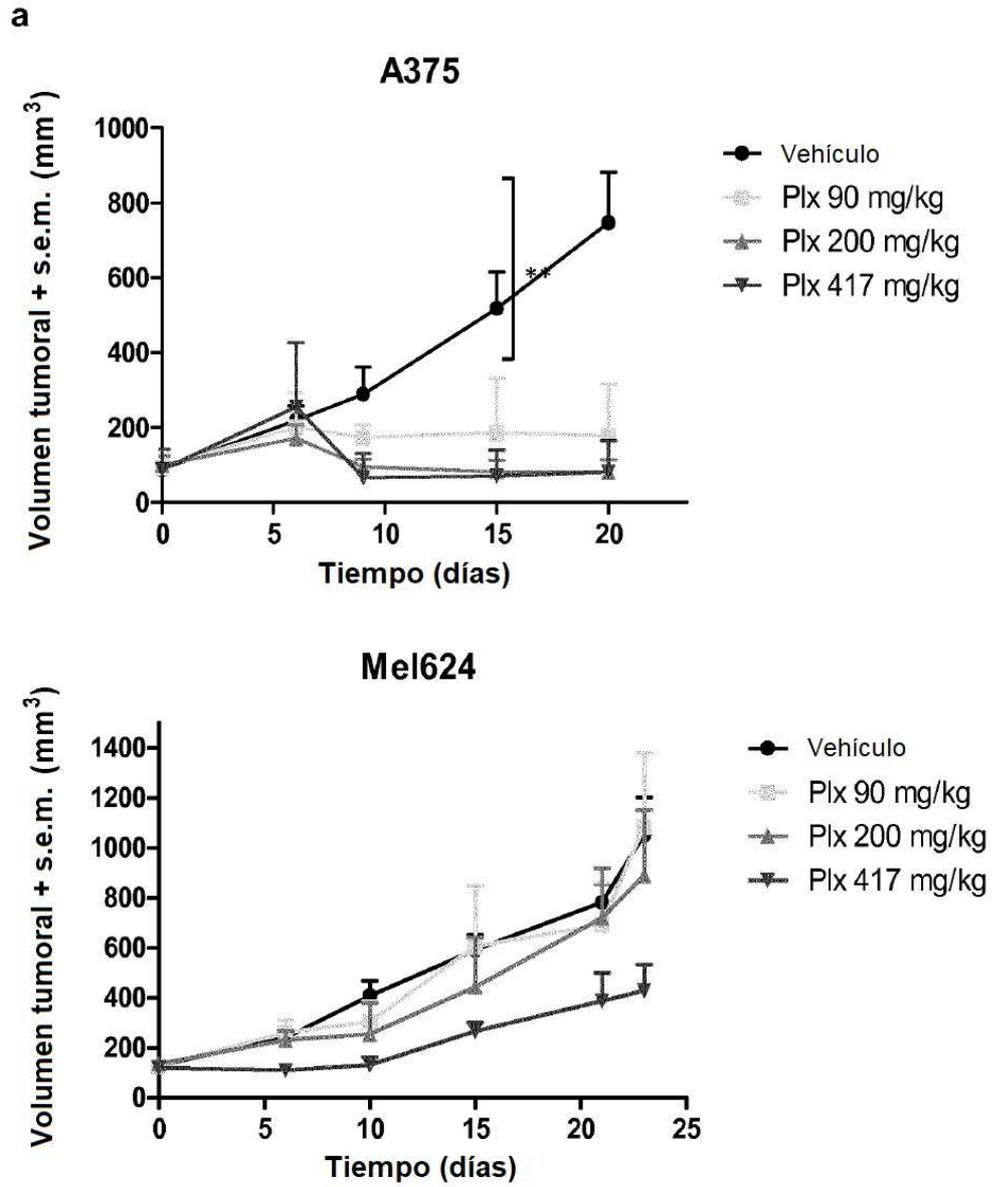


Figura 8

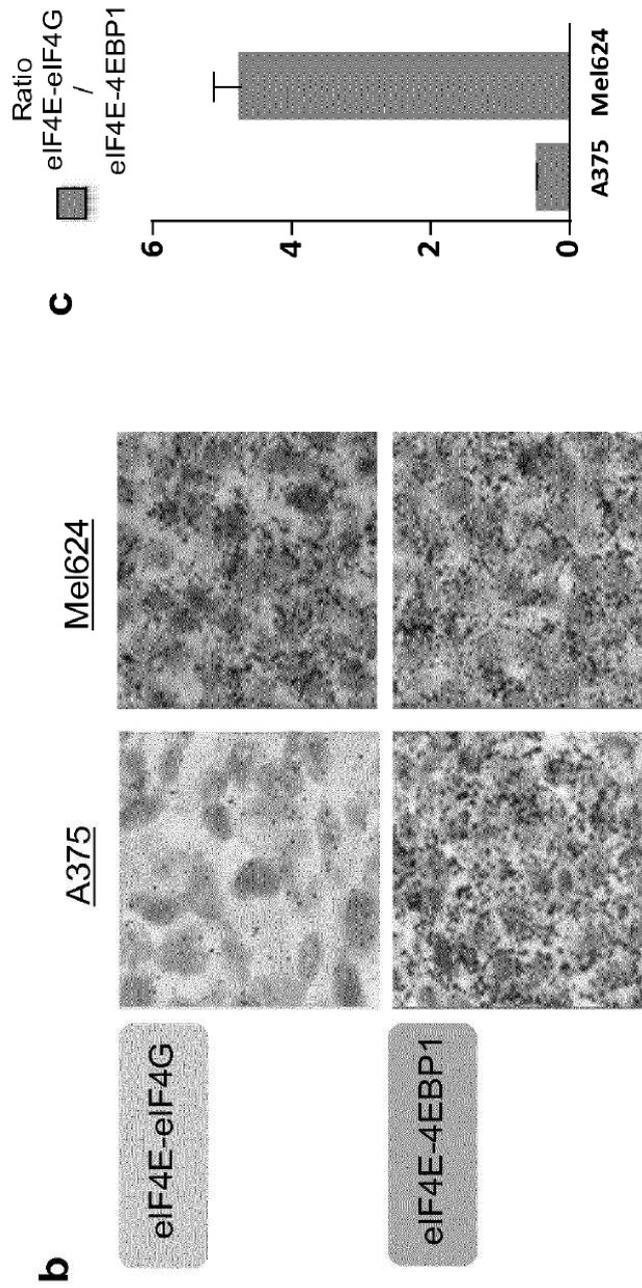


Figura 8 (cont.)

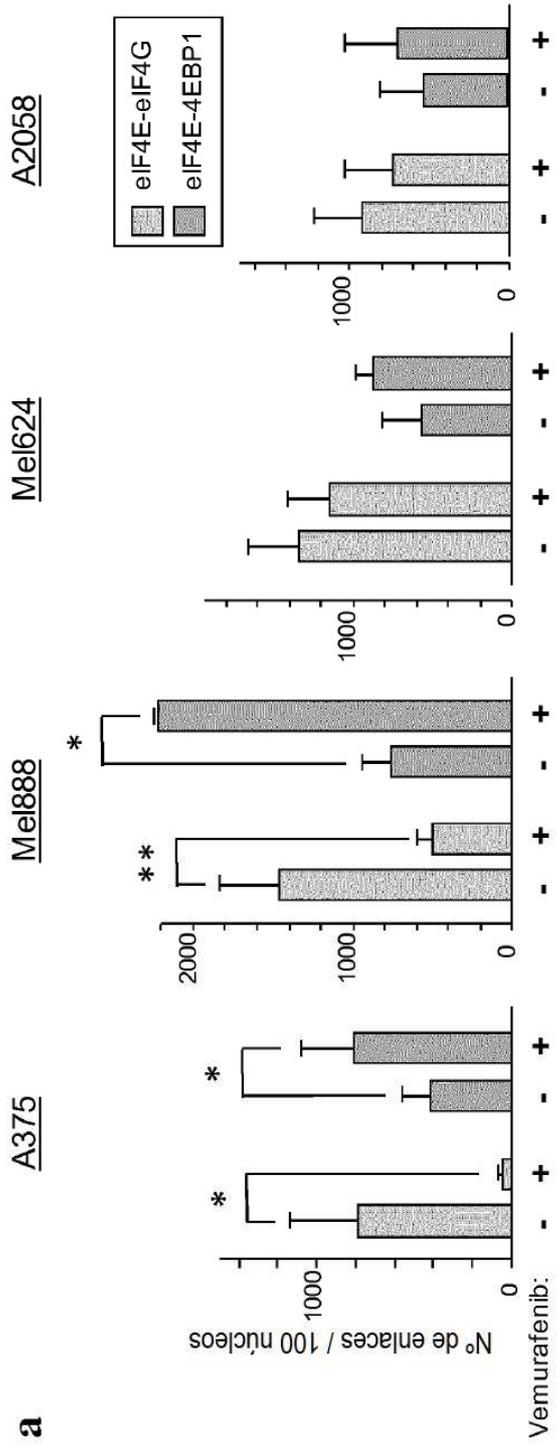


Figura 9

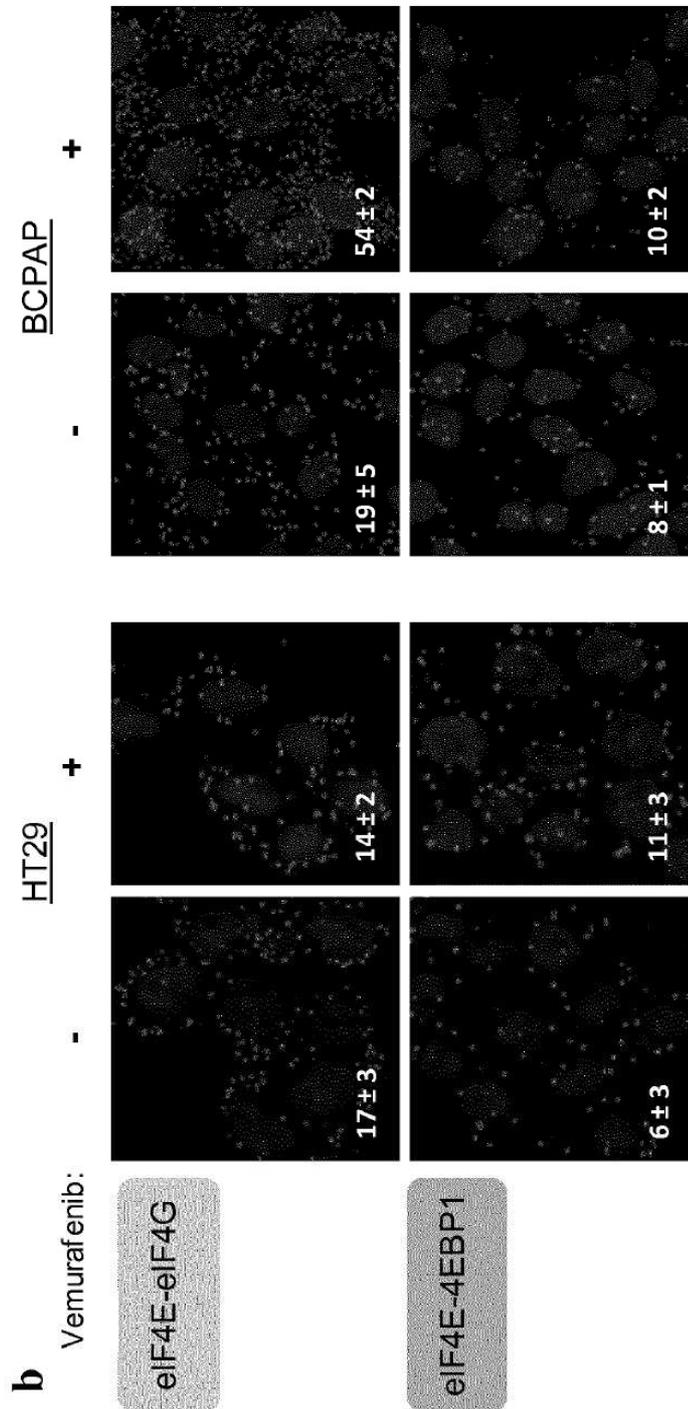


Figura 9 (cont.)

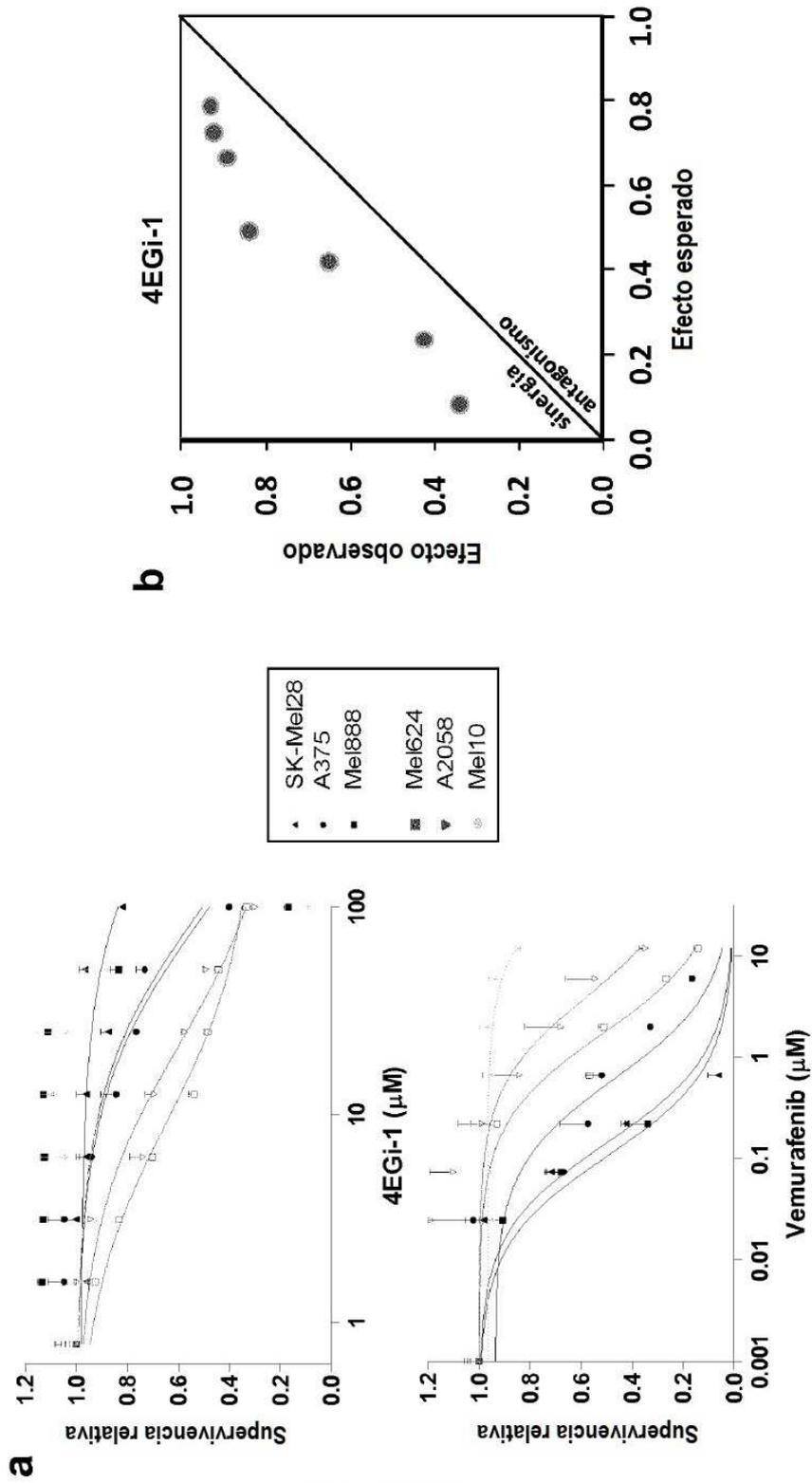


Figura 10

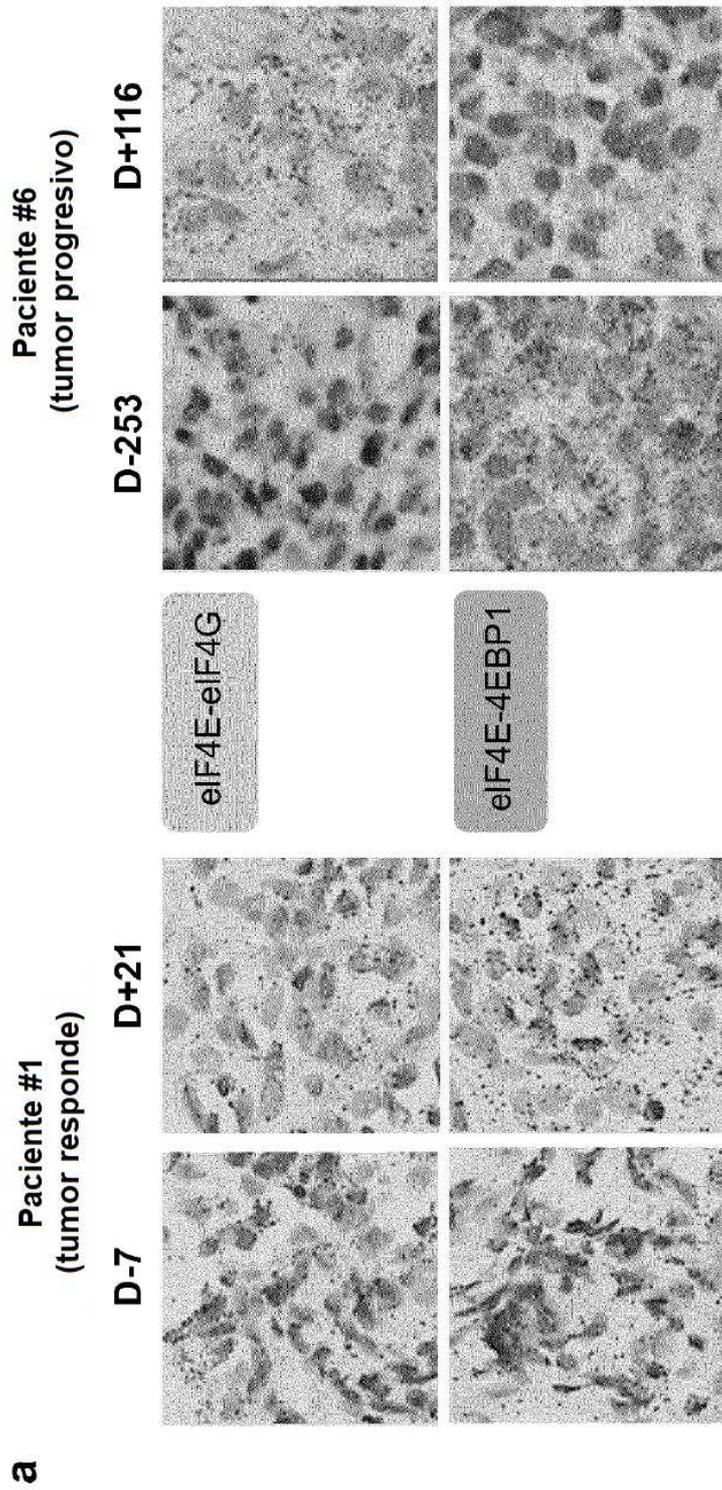


Figura 11

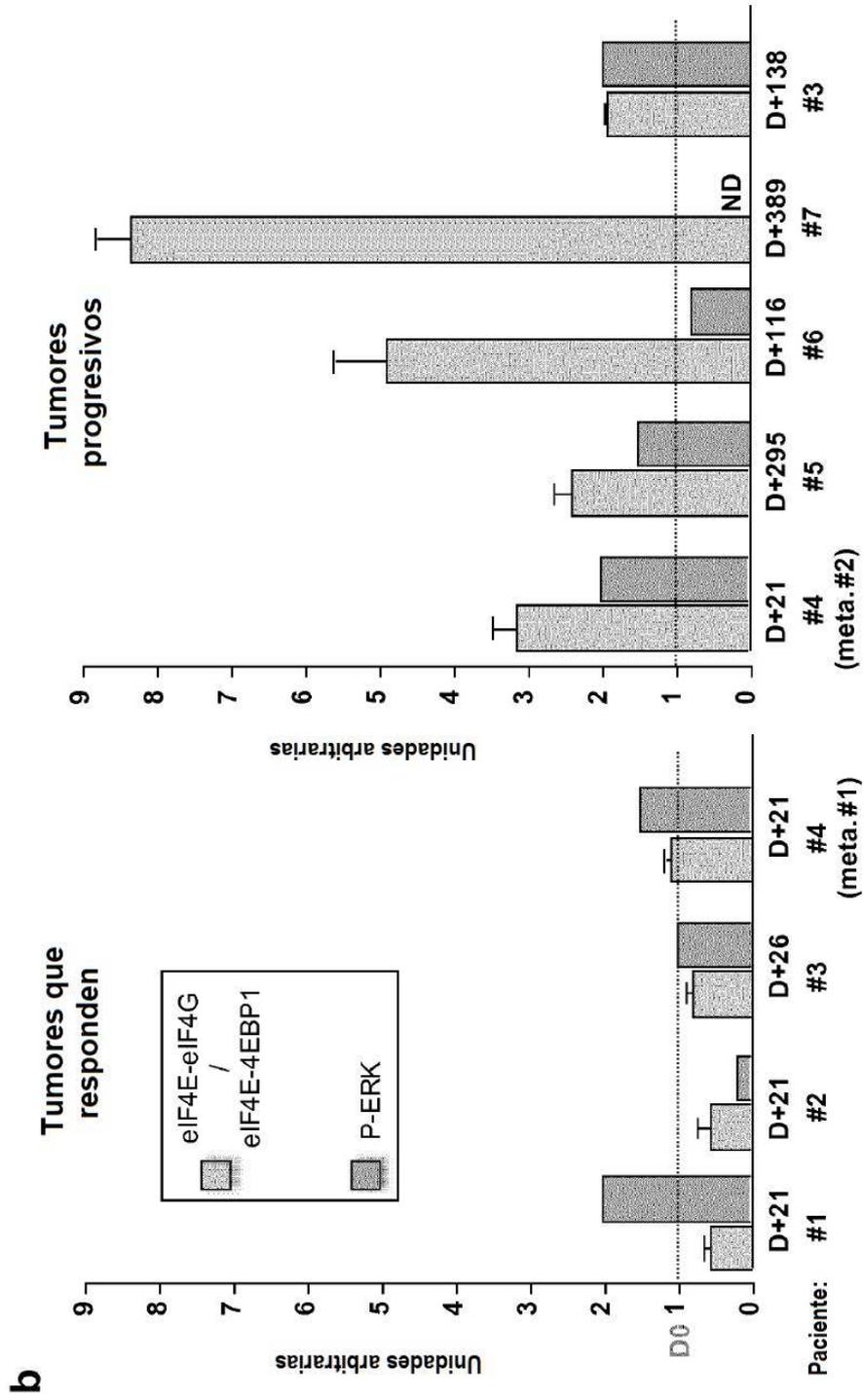


Figura 11 (cont.)