

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 925**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
A61P 35/04 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2015** **PCT/EP2015/076404**
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016** **WO16075221**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2015** **E 15794549 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 3177641**

54 Título: **Agente específico de RANKL para el tratamiento de una enfermedad metastásica**

30 Prioridad:

14.11.2014 EP 14193179

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2020

73 Titular/es:

PROBIOCON GMBH (100.0%)
Moosackerweg 6
4148 Pfeffingen, CH

72 Inventor/es:

SALIH, HELMUT;
GROSSE-HOVEST, LUDGER;
HERRMANN, ANDREAS;
KOPP, HANS-GEORG y
MAURER, STEFANIE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 739 925 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).

DESCRIPCION

Agente específico de RANKL para el tratamiento de una enfermedad metastásica

Campo técnico

5 La invención se refiere a un agente antagónico específico de RANKL que reconoce y opcionalmente neutraliza el ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa-B expresado en plaquetas humanas (pRANKL), para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer, un método para identificar un agente candidato principal, y un método para predecir el potencial metastásico en un paciente con cáncer.

Antecedentes

10 Un amplio campo de investigación y desarrollo se centra en el tratamiento del cáncer. Los productos en desarrollo abarcan desde inhibidores de quinasas hasta inhibidores de la angiogénesis, anticuerpos monoclonales contra dianas tumorales, inductores de apoptosis, vacunación antitumoral y agentes quimioterapéuticos convencionales contra diversas dianas tumorales y con diversos efectos citotóxicos. El pronóstico de los pacientes con cáncer está determinado principalmente por el riesgo de desarrollar metástasis.

15 Durante la metástasis, las células anfitrionas son reclutadas por las células tumorales diseminadas para formar microentornos especializados ("nichos") que promueven la progresión metastásica, pero los mecanismos que guían el ensamblaje de estos nichos son en gran parte desconocidos. Labelle et al. (PNAS 2014, E3053-3061) describen, p. ej., que se requieren señales derivadas de plaquetas en lugar de derivadas de células tumorales para el rápido reclutamiento de granulocitos por las células tumorales para formar "nichos metastásicos tempranos". Se describe que las plaquetas interactúan con las células tumorales durante su tránsito a través de la circulación, formando así
20 agregados de plaquetas-células tumorales y potenciarían la metástasis a través de múltiples mecanismos.

Gay et al. (Nature Reviews 2011, 11:123-134) revisan la contribución de las plaquetas a la metástasis tumoral. Entre otras, dentro del sistema circulatorio, las plaquetas protegerían las células tumorales de la eliminación inmunitaria y promoverían su detención en el endotelio, apoyando el establecimiento de lesiones secundarias. La adhesión de las plaquetas a las células tumorales y su incorporación a los heteroagregados plaquetarios se describe para proteger
25 las células tumorales de la actividad de las células NK.

Las metástasis óseas son una complicación frecuente de muchos cánceres que dan como resultado una carga severa de la enfermedad y dolor. La regulación de la migración de células cancerosas y la metástasis ósea por el ligando de RANK (receptor activador de NF- κ B) (RANKL) es descrita por Jones et al. (Nature 2006, 440:692-696). RANKL desencadena la migración de células de cáncer epitelial humano y células de melanoma que expresan el receptor RANK. RANK se expresa en una serie de líneas celulares de cáncer y células cancerosas en pacientes. En un modelo de ratón de metástasis de melanoma, la neutralización *in vivo* de RANKL por la osteoprotegerina da como resultado una protección completa contra la parálisis y una reducción marcada de la carga tumoral en los huesos, pero no en otros órganos. El RANKL producido por el microentorno óseo se considera un suelo fértil para las células tumorales positivas para RANK.
30

Dougall et al. (BoneKEy Reports 2014, 3:519) describen RANKL, un mediador esencial de la función y la supervivencia de los osteoclastos, que actúa a través de su receptor cognado, RANK. Los datos preclínicos han establecido firmemente que el bloqueo de la osteoclastogénesis inducida por tumores por la inhibición de RANKL no solo protegería contra la destrucción ósea, sino que también inhibiría la progresión de las metástasis óseas establecidas y retrasaría la formación de metástasis óseas *de novo* en modelos de cáncer. En pacientes con metástasis óseas, las complicaciones esqueléticas son impulsadas por el aumento de la actividad osteoclástica y pueden ocasionar fracturas patológicas, compresión de la médula espinal y la necesidad de radioterapia en el hueso o cirugía ortopédica (en conjunto, se conocen como eventos relacionados con el esqueleto (SRE)). Se ha descrito el denosumab, un anticuerpo monoclonal completamente humano contra RANKL, para prevenir o retrasar los SRE en pacientes con tumores sólidos que han metastatizado en hueso. Además de su papel central en la osteólisis inducida por tumores, la destrucción ósea y la progresión del tumor esquelético, existen evidencias emergentes de los efectos prometastásicos directos de RANKL, independientemente de los osteoclastos. Por ejemplo, RANKL también estimula la metástasis a través de la actividad en células cancerosas que expresan RANK, lo que da como resultado un aumento de la invasión y la migración.
40
45

Tan et al. (Nature 2011, 470 (7335):548-553) describen que las células T CD4+ infiltrantes de tumores reclutadas por fibroblastos estimulan la metástasis del cáncer de mama a través de la señalización RANKL-RANK.
50

El denosumab fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos para su uso en mujeres posmenopáusicas con riesgo de osteoporosis con el nombre comercial Prolia, y como Xgeva, para la prevención de SRE en pacientes con metástasis óseas de tumores sólidos. Los ensayos clínicos investigaron Denosumab en tumores de células gigantes, mieloma múltiple con metástasis óseas e hipercalcemia por neoplasias malignas.
55

Las terapias dirigidas a RANK/RANKL p. ej. implican aglutinantes específicos de RANKL, entre ellos Denosumab,

RANK-Fc recombinante (Schmiedel et al. 2013, Cancer Res. 73(2):683-94), o RANKL-nanoanticuerpos (documento WO2008142164A2). Los péptidos de unión a RANKL se describen para inhibir la resorción ósea y/o la actividad de los osteoclastos (documento WO2012163887A1).

El efecto de Denosumab sobre la metástasis ósea en pacientes con tumores sólidos avanzados se describe en una serie de documentos, p. ej., Rolfo Christian et al. (Expert Opinion on Biological Therapy, vol. 14, núm. 1, 2014, pág. 15-26), Scagliotti Giorgio Vittorio et al. (Journal of Thoracic Oncology, vol. 7, núm. 12, 2012, pág. 1823-1829), Morikawa K. et al. (Database Embase, Elsevier Science publishers, Amsterdam, XP002736136; y Japanese Journal of Lung Cancer, vol. 52, núm. 7, 2012, pág. 1035-1040), Takeshi Yuasa et al. (Oncotargets and Therapy, vol. 5, 2012, pág. 221-229), Hilbe Wolfgang et al. (Magazine of European Medical Oncology, AT, vol. 6, núm. 2, 2013, pág. 75-82), László Kopper (Pathology & Oncology Research, vol. 18, núm. 4, 2012, pág. 743-747), Sonya J. Snedecor et al., (Clinical Therapeutics, vol. 34, núm. 6, 2012, pág. 1334-1349), Sarah Payton (Nature Reviews Urology, vol. 9, núm. 1, 2011, pág. 1-1), documento WO 2013/176469 y DATABASE WPI, Thomson Scientific, London, GB, XP002736138; documento US 2012/114665 A1, y documento WO 01/08699 A1).

Nakanishi et al. (Platelets 2014, Early Online 1-7) describen el papel de las plaquetas para mejorar la respuesta Th2 mediada por células dendríticas (CD) que contribuyen a la inflamación alérgica. Se encontró que las plaquetas activadas por el péptido agonista del receptor de trombina (TRAP) expresaban RANKL e inducían la maduración de las CD mieloides.

B.A. Kerr et al. (Oncogene, vol. 32, núm. 36, 2013, pág. 4319-4324) describen el papel de las plaquetas que gobiernan la comunicación del tumor premetastásico con el hueso.

Sharma Deva et al. (Journal of Cellular Physiology, vol. 229, núm. 8, 2014, pág. 1005-1015) describen el papel de las plaquetas en la progresión del tumor. Las plaquetas se describen por proteger las células tumorales de las respuestas inmunitarias del anfitrión y promover la supervivencia de las células tumorales.

Esposito Mark et al. (Pharmacology and Therapeutics, GB, vol. 151, núm. 2, pág. 222-233) describen el direccionamiento de las interacciones estromales tumorales en la metástasis ósea. Se describe que la supervivencia de las células tumorales circulantes se ve aumentada por la secreción plaquetaria de TGFbeta y la formación de agregados plaquetarios.

Compendio de la invención

El objeto de la invención es proporcionar un tratamiento mejorado de la enfermedad metastásica y los respectivos agentes antimetastásicos.

El objeto es resuelto por el tema principal de la invención.

La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona un agente antagonista específico de RANKL que reconoce el ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa-B expresado en plaquetas humana (pRANKL), para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer en estadio temprano para reducir las lesiones de células cancerosas circulantes premetastásicas en la sangre. Específicamente, el uso médico comprende la prevención o reducción de agregados de células circulantes prometastásicas de plaquetas con células cancerosas. Tales agregados comprenden específicamente las plaquetas como plaquetas activadas que expresan el pRANKL. Específicamente, el agente antagonista específico de RANKL se utiliza en una cantidad eficaz para prevenir la transducción de señales tras la interacción RANK-RANKL que facilita la metástasis en la formación de tales agregados de células circulantes prometastásicas en sangre, o para prevenir la formación de tales agregados de células circulantes prometastásicas en sangre.

En particular, la unión y neutralización de pRANKL inhibiría

a) la diseminación de células tumorales premetastásicas,

b) la activación de plaquetas y/o células cancerosas (o tumorales) para expresar pRANKL o para inducir la señalización RANK-RANKL, inhibiendo así la transformación de las células para convertirse en premetastásicas, y/o

c) el riesgo de desarrollar diseminación hematogena opcionalmente seguida de formación de metástasis.

pRANKL específicamente resulta estar regulado por incremento al interactuar con las células cancerosas. Por lo tanto, la inhibición o neutralización de pRANKL por el agente como se describe en la presente memoria, modularía por disminución la lesión premetastásica.

Las lesiones premetastásicas implican típicamente células de una lesión precursora, que se caracteriza por cambios en la apariencia o la naturaleza de la célula antes de que se convierta en cancerosa, o en el caso de una célula cancerosa antes de que se convierta en metastásica.

Por lo tanto, la invención proporciona un nuevo método de tratamiento, en donde un paciente con cáncer se trata

con el agente en una cantidad eficaz para prevenir o reducir las lesiones premetastásicas.

Específicamente, las células cancerosas se originan a partir de células cancerosas positivas para RANK. Las células cancerosas pueden ser células cancerosas formadoras de tumores positivos para RANK o células tumorales, en particular células tumorales sólidas, o células cancerosas positivas para RANK que implican la sangre y los órganos formadores de sangre, p. ej. leucemia. Específicamente, las lesiones premetastásicas se identifican mediante la determinación de agregados de plaquetas activadas-células cancerosas, que se consideran cúmulos de células premetastásicas circulantes que forman nichos, lo que promueve la metástasis del cáncer o aumenta el riesgo de desarrollar metástasis, p. ej. en órganos distantes o metástasis óseas. Al interactuar con las plaquetas activadas, las células cancerosas pueden transformarse en células cancerosas positivas para RANKL, que son una característica adicional de las lesiones premetastásicas. Dado que tales agregados plaquetas-células cancerosas son transportados por la sangre, el riesgo o potencial metastásico también se conoce como transportado por la sangre o hematógeno.

El agente puede reconocer y neutralizar específicamente solo pRANKL, o reconocer específicamente de manera cruzada varias formas de RANKL. Específicamente, el agente tiene reactividad cruzada, reconoce y opcionalmente neutraliza pRANKL y al menos uno del ligando de receptor activador del factor nuclear kappa-B soluble (sRANKL) y ligando del activador del factor nuclear kappa-B unido a la membrana (mRANKL), o ambos.

Específicamente, el agente está reconociendo el polipéptido RANKL, que puede comprender la secuencia completa de aminoácidos de RANKL humano (SEC ID 3), o un epítipo en la porción extracelular del pRANKL, p. ej. AA 69 - AA 317 de SEC ID 3), en particular compitiendo por la unión de RANK a RANKL o pRANKL y opcionalmente cualquier otra forma de RANKL, y por lo tanto inhibiendo sustancialmente la señalización RANK-RANKL.

Específicamente, el agente se une a pRANKL, lo que impide que pRANKL active su receptor en las células cancerosas, p. ej. en células tumorales que se diseminan o metastatizan.

Específicamente, el agente se une al monómero, o multímero de pRANKL, tal como un multímero de moléculas de RANKL que interactúan en la superficie de las plaquetas, p. ej. en donde una o más moléculas de pRANKL están unidas a la superficie de las plaquetas que interactúan entre sí, y/o que interactúan con una o más moléculas de RANKL que no están unidas a las plaquetas, o sRANKL. Tal multímero puede ser un dímero, trímero o multímero superior, formando preferiblemente un complejo con pRANKL unido a la superficie de las plaquetas y/o pRANKL escindido de la superficie de las plaquetas, y/o sRANKL, y/o mRANKL. Por lo tanto, la unión puede producir, por ejemplo, en la superficie de la plaqueta, en el microentorno entre una plaqueta y una célula cancerosa, o en la circulación tras la escisión del pRANKL de la superficie de la plaqueta.

Específicamente, la metástasis es transportada por la sangre, con agregación de células tumorales en órganos distantes, p. ej. cualquiera de pulmón, hígado, intestino, piel, músculo, bazo, páncreas, riñón, hueso o cerebro. Específicamente, el riesgo de desarrollar enfermedad metastásica hematológica en un paciente que padece un tumor sólido primario o cáncer de la sangre y el sistema linfático se puede reducir de manera eficaz.

Específicamente, el paciente con cáncer tiene riesgo de padecer una enfermedad residual mínima y/o una recurrencia de la enfermedad metastásica, opcionalmente en donde el paciente tiene un nivel detectable de células tumorales circulantes en una muestra de sangre, p. ej. según lo determinado por el número de células tumorales diseminadas en sangre completa o una fracción de la misma, o por un marcador de célula tumoral específico. Un número detectable de células tumorales es p. ej. menos de 10, o menos de 5, o 4, 3, 2 o 1 células tumorales circulantes en una muestra de sangre completa de al menos 5 mL, o 7,5 mL, o 10 mL.

De acuerdo con una realización específica, el paciente sufre de un tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en tumores epiteliales y tumores mesenquimales, o tumores de origen endodérmico, mesodérmico y/o ectodérmico, o un cáncer transportado por la sangre, como la leucemia.

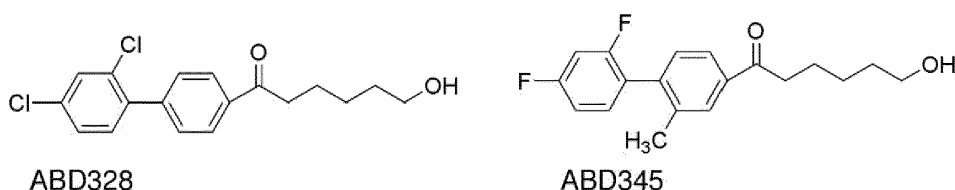
Específicamente, el paciente padece cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de esófago, carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón, cáncer de colon/recto/colorrectal, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello o leucemia.

Según un aspecto específico, el tratamiento se combina con una intervención quirúrgica para extirpar al menos parte de un tumor y/o se combina con radioterapia, y el agente se administra para terapia neoadyuvante o coadyuvante. En consecuencia, el paciente se está preparando específicamente para una intervención quirúrgica y/o radioterapia, o ha sido tratado mediante una intervención quirúrgica y/o radioterapia, y se trata adicionalmente con el agente de acuerdo con la invención antes o después de la cirugía. De acuerdo con ejemplos específicos, tal tratamiento puede comenzar entre 1 a 30 días antes de la cirugía, o durante la cirugía, o en el plazo de 1 a 30 días después de la cirugía, y el agente se puede administrar durante un período continuado, p. ej. durante 1 a 12 meses, o incluso más, en donde el agente se administra a intervalos regulares. Las intervenciones quirúrgicas son p. ej. eliminación terapéutica de la masa tumoral, o biopsia. La cirugía se considera un factor de riesgo específico para diseminar células tumorales en el torrente sanguíneo, lo que provoca la formación de agregados de plaquetas-células tumorales. Del mismo modo, la radioterapia puede desencadenar la diseminación hematológica de las células tumorales. Por lo tanto, el método de la invención está específicamente indicado combinado con cirugía y/o

radioterapia lo que potencialmente disemina células tumorales sólidas.

De acuerdo con un aspecto específico, el agente se administra al paciente combinado con una terapia combinada de coadyuvante o neoadyuvante, preferiblemente quimioterapia, terapia con inhibidor de quinasa y/o inmunoterapia. Tal terapia combinada se dirigiría específicamente a la célula cancerosa, p. ej. cualquier antígeno asociado a tumor, tal como los seleccionados del grupo que consiste en marcador de células de cáncer epitelial, factores solubles o terapia antiangiogénica.

De acuerdo con un aspecto específico, el agente se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión del receptor, tales como proteínas de fusión RANK-Fc, péptidos, tales como formas inactivadas de osteoprotegerina, o fragmentos de las mismas, moléculas pequeñas, tales como moléculas pequeñas orgánicas específicas de RANK, o aptámeros. Las moléculas pequeñas ilustrativas son inhibidores de molécula pequeña de RANKL y TNF, tales como las descritas por Coste E, et al. Ann Rheum Dis 2015; 74:220-226. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203700. Los ejemplos específicos son derivados del éster del ácido bifenilcarboxílico del butanodiol, que son capaces de inhibir la fosforilación de I κ B inducida por RANKL y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Por ejemplo, se pueden utilizar compuestos en los que el enlace éster se reemplaza por una cetona, tales como ABD328 y ABD345 caracterizados por la siguiente fórmula:



Específicamente, el agente es un anticuerpo humano o humanizado, tal como Denosumab, o una variante funcional del mismo, o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores, o una proteína de fusión RANK-Fc. Denosumab (Amgen, Thousand Oaks, CA, EE.UU.) Es un anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano específico para RANKL, que se ha descrito que suprime los marcadores de resorción ósea en pacientes con una variedad de tumores metastásicos y se está investigando en múltiples ensayos clínicos para la prevención y tratamiento de metástasis óseas. Químicamente, consiste en 2 cadenas pesadas y 2 ligeras. Cada cadena ligera consiste en 215 aminoácidos. Cada cadena pesada consiste en 448 aminoácidos con 4 disulfuros intramoleculares. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se identifica mediante SEC ID 1; la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se identifica mediante SEC ID 2.

Específicamente, el agente comprende un fragmento de anticuerpo Fc, tal como un Fc de IgG1 humana, diseñado para reducir la función efectora de Fc (p. ej., que no se une significativamente a Fc γ R1 o CD16) y, por lo tanto, no presenta una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) significativa. Los fragmentos de Fc ilustrativos que comprenden mutaciones puntuales para reducir la función efectora de Fc se caracterizan por al menos una de las siguientes mutaciones: E233P, L234V, L235A, deltaG236, A327G, A330S, en donde la nomenclatura es según el índice EU de Kabat.

Alternativamente, el agente comprende un fragmento de anticuerpo Fc, tal como un Fc de IgG1 humana, con función efectora de Fc (p. ej., de unión a Fc γ R1 o CD16), tal como ADCC. Tal agente tendría la ventaja adicional de la defensa inmunitaria mediada por células, por lo que una célula efectora del sistema inmunitario destruye activamente la célula diana, que es la plaqueta y/o la célula cancerosa, preferiblemente el agregado de plaquetas y cáncer.

De acuerdo con un aspecto específico, el agente se administra al paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante administración sistémica, preferiblemente mediante infusión intravenosa o inyección en bolo.

La terapia de la técnica anterior con Denosumab típicamente implicaría tratamiento subcutáneo. La presente invención se dirigiría a las plaquetas circulantes activadas que expresan RANKL, o agregados de plaquetas-células cancerosas circulantes. Por lo tanto, la vía intravenosa se prefiere específicamente.

Las dosis preferidas son, p. ej. las que varían de 0,5 a 1000 mg, preferiblemente 1-400 mg. Si se administra por vía subcutánea, la dosificación preferida varía de 0,5 a 400 mg.

La invención proporciona adicionalmente un método para identificar un agente candidato principal que es eficaz en la prevención o el tratamiento de lesiones premetastásicas, o una enfermedad residual mínima y/o recurrencia de la enfermedad metastásica en un paciente con cáncer, tal como un paciente que se prepara o se somete a una intervención quirúrgica para eliminar al menos parte de un tumor sólido y/o radioterapia, o que se haya sometido a tal intervención quirúrgica y/o radioterapia, comprendiendo el método el escrutinio de uno o más agentes de prueba en un ensayo basado en células, cuyo ensayo comprende las etapas de:

a) proporcionar un cultivo de células cancerosas;

b) poner en contacto el cultivo celular con plaquetas de sangre humana en una mezcla de reacción con un agente de prueba; y

c) detectar si el agente de prueba

i) inhibe la señalización de RANK por pRANKL; y/o

5 ii) disminuye el nivel de unión de las plaquetas a las células cancerosas;

identificando así un agente candidato principal para prevenir o tratar lesiones premetastásicas y, opcionalmente, su potencial para prevenir o tratar una enfermedad residual mínima y/o la recurrencia de la enfermedad metastásica en un paciente con cáncer.

Específicamente, la etapa de detección c) implica la prueba de ambos, si el agente de prueba

10 i) inhibe la señalización de RANK por pRANKL; y

ii) disminuye el nivel de unión de las plaquetas a las células cancerosas.

Específicamente, las plaquetas activadas se utilizan en tal ensayo de escrutinio, tal como plaquetas activadas por trombina, o aquellas activadas por células cancerosas o tumorales, p. ej. activadas por células tumorales negativas para RANKL, para expresar pRANKL.

15 Específicamente, el ensayo es un ensayo funcional de antagonismo o de neutralización que mide la capacidad de un antagonista putativo (un agente de prueba) para inhibir la señalización del receptor (RANK) mediada por un agonista (RANKL). Por ejemplo, un compuesto se puede identificar como un agente antagónico específico de RANKL si el compuesto inhibe sustancialmente la señalización mediada por el receptor.

20 La invención proporciona adicionalmente un método para predecir el potencial metastásico en un paciente con cáncer, que comprende

a) proporcionar una muestra de sangre periférica o una fracción de sangre que contenga plaquetas;

b) determinar la expresión de pRANKL en dicha muestra y compararla con un valor de referencia, siendo la expresión diferencial indicativa de lesiones premetastásicas y un mayor potencial de desarrollar metástasis distantes.

25 Por ejemplo, la muestra o las plaquetas se pueden incubar con células cancerosas convencionales con potencial metastásico definido, y el nivel de señalización de RANK por la interacción de plaquetas-células cancerosas se puede determinar para obtener un valor de referencia para un potencial metastásico específico. Del mismo modo, las plaquetas se pueden activar con trombina y se puede determinar el nivel de pRANKL en la muestra en comparación con un patrón.

30 La expresión pRANKL se determina, p. ej., como el nivel de expresión de pRANKL, tal como la expresión de una secuencia de nucleótidos o el polipéptido de pRANKL, o un fragmento de los mismos. El nivel se puede determinar cualitativamente, pero también semicuantitativamente o cuantitativamente.

35 El valor de referencia se puede obtener a partir de un control positivo o negativo, o ambos. El control positivo p. ej. representa el nivel de expresión de pRANKL de las plaquetas de un paciente de cáncer que padece afecciones de enfermedad metastásica. El control negativo p. ej. representa el nivel de expresión pRANKL de un sujeto de control sano.

Figuras

40 **Figura 1: Modelo de metástasis pulmonar utilizando células de melanoma transfectadas con RANKL.** Se inyectaron células de melanoma murino B16-F10 (ATCC), que se identificarán mediante color negro) que se habían transfectado para expresar RANKL humano (RANKL+) o células de control (parentales) en la vena de la cola de ratones C57BL/6. Células B16-F10 (100.000 células por ratón). Después de pasar por el corazón a través del torrente sanguíneo, las células malignas se diseminan a los pulmones. La carga metastásica en el pulmón de los animales se analizó después de 3 semanas, mostrando un drástico aumento de la metástasis al aumentar la señalización mediada por RANKL cuando se utilizaron células RANKL+. Esto se revela por la mayor cantidad de zonas de color negro en los pulmones y la destrucción de la arquitectura de los pulmones.

45 **Figura 2: Expresión de RANKL en trombocitos en reposo y activados.** Las plaquetas humanas de donantes sanos se aislaron mediante centrifugación de muestras de sangre y a continuación se estimularon con 0,2 U/mL del agonista plaquetario clásico Trombina (activado) o se dejaron sin tratar (en reposo). La expresión en la superficie de las plaquetas del marcador de activación P-selectina (CD62P) y RANKL se analizó mediante citometría de flujo.

50 **Figura 3: Estructura de RANK-Fc-KO.** Las proteínas de fusión RANK-Fc-KO consisten en el dominio extracelular

del receptor humano RANK (Q25-P207; Referencia Gen Bank NP_0003830) y una porción Fc de IgG1 humana (P217-K447) que contiene intercambios de aminoácidos E233P/L234V/L235A/ΔG236/A327G/A330S; Armour et al. 2003, Mol Immunol. 40(9):585-93; Schmiedel et al. 2013) para disminuir su afinidad y, en consecuencia, unirse al receptor de Fc CD16. Aquí, toda la numeración está de acuerdo con Kabat [Índice EU].

Figura 4: Modelo de metástasis pulmonar utilizando RANK-Fc-KO. Se inyectaron células de melanoma B16-F10 parentales en la vena de la cola de los números indicados de ratones C57BL/6 (75.000 por ratón). Además, los ratones de los diferentes grupos se trataron por agotamiento de plaquetas mediante la aplicación de 3 µg/g de anticuerpo anti-GPIIbα 24 h antes de la inyección de la célula tumoral, RANK-Fc-KO (100 µg por ratón, el día de la inyección de la célula tumoral, repetida dos y cuatro días después), así como los controles apropiados (ctrl) como se indica. El número de metástasis pulmonares se contó después del sacrificio de los ratones después de 3 semanas.

Figura 5: Prevención de la señalización de TEM inducida por plaquetas (prometastásica) en células MCF10A inmortalizadas mediante bloqueo de RANKL. Las células MCF10A (ATCC) como modelo convencional para el análisis de TEM se estudiaron mediante una PCR cuantitativa en tiempo real para (A) RANKL y (B) los marcadores para el fenotipo mesenquimal ZEB (homeobox 1 de la unión a la caja E de dedos de Zinc, columna izquierda) y N-Cadherina columna derecha). Con este fin, se aisló el ARN, se transcribió de manera inversa y se sometió a PCR basada en SYBR-green mediante técnicas de rutina.

(A) Se muestra la razón de la diana (RANKL) con respecto a la expresión del gen de referencia (RPL13) de las células MCF10A y los controles apropiados. Los resultados no muestran diferencias entre el control negativo y las células MCF10A, excluyendo así que las propias células MCF10A expresen RANKL.

(B) El análisis de las firmas del gen TEM prometastásico en células MCF10A se realizó después de 2 días de cultivo solo (sin tratar) o con plaquetas (razón plaquetas/células tumorales 5:1) en presencia o ausencia del anticuerpo neutralizante de RANKL Denosumab (10 µg/ml). La presencia de plaquetas causó la inducción de la expresión del ARNm de ZEB y N-Cadherina como marcadores para la expresión del gen TEM prometastásico que se redujo sustancialmente por la presencia de Denosumab.

Figura 6: Secuencias

Secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de Denosumab:

SEC ID 1: cadena pesada

SEC ID 2: cadena ligera

Secuencia de aminoácidos de RANKL humano (GenBank: AAB86811.1):

SEC ID 3: secuencia completa

Figura 7: La neutralización de RANKL previene la migración inducida por plaquetas de células MCF10A inmortalizadas. Se sembraron 1×10^5 células MCF10A en la cámara superior de un inserto Transwell (tamaño de poro de 8 µm) solas (sin tratar) o con plaquetas humanas ($1,5 \times 10^5/\mu\text{l}$) en presencia o ausencia del anticuerpo neutralizante de RANKL Denosumab o el control de isotipo respectivo (cada 5 µg/mL). Después de 24 h de incubación, se añadió EGF (20 ng/ml) a la cámara inferior para que actuara como quimioatrayente. Después de un total de 48 h de incubación, las células no móviles en el lado superior de la membrana se eliminaron, mientras que las células migradas en el lado inferior se fijaron, se tiñeron con DAPI y se contaron al microscopio.

Figura 8: Modelo de metástasis pulmonar utilizando ratones modificados para inactivar la expresión de RANKL específico de plaquetas. Se obtuvieron ratones B6.129-*Tnfrsf11*^{tm1.1Caob/J} en los que el gen RANKL está flanqueado por sitios loxP (en lo sucesivo, referido como RANKL fl/fl) y ratones C57BL/6-Tg (Pf4-cre)Q3Rsko/J que contienen una recombinasa específica de megacariocitos/plaquetas (en lo sucesivo, referida como Pf4cre) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE. UU.), se criaron para generar ratones modificados para inactivar (ko) RANKL fl/fl Pf4 cre/+ en los que RANKL se inactiva específicamente en megacariocitos/plaquetas. Para la determinación de los efectos de RANKL expresado en plaquetas, se inyectaron células de melanoma B16-F10 (75.000 por ratón) a través de la vena de la cola en ratones modificados para inactivar (ko) RANKL fl/fl Pf4 cre/+ o ratones C57BL/6 de control (ctrl) (ko, n = 8 animales; ctrl, n = 5 animales). El número de metástasis pulmonares se contó después del sacrificio de los ratones después de 3 semanas.

Figura 9: La neutralización de RANKL previene la señalización de TEM prometastásica inducida por plaquetas en células de melanoma SK-Mel. (A) Las células SK-Mel (ATCC) se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-RANKL (histograma relleno) o el control de isotipo respectivo (línea de puntos) seguido de anti-PE de ratón. No se observaron diferencias entre el control de isotipo y la unión de anticuerpos específicos de RANKL, excluyendo así que las células SK-Mel expresaran RANKL.

(B) El análisis de las firmas del gen TEM prometastásico en células de melanoma SK-Mel se realizó después de 1 día de cultivo solo (sin tratar) o con plaquetas (razón plaquetas/células tumorales 200:1) o plaquetas y

el anticuerpo neutralizante de RANKL Denosumab (5 µg/mL). A continuación se analizaron los marcadores de fenotipo mesenquimal, ZEB (homeobox 1 de unión a la caja E del dedos de Zinc), Twist y vimentina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Con este fin, se aisló el ARN, se transcribió de manera inversa y se sometió a PCR basada en SYBR-green mediante técnicas de rutina.

- 5 La presencia de plaquetas indujo la expresión de ARNm prometastático de los tres genes marcadores que se redujo sustancialmente por la presencia de Denosumab.

Descripción detallada de la invención

El término "coadyuvante" como se emplea en la presente memoria se referirá al tratamiento del cáncer durante o después de una intervención quirúrgica y/o radioterapia, p. ej. para mejorar la terapia.

- 10 El término "neoadyuvante" como se emplea en la presente memoria se referirá al tratamiento del cáncer antes de una intervención quirúrgica y/o radioterapia, p. ej. para mejorar la terapia.

El término "agente antagónico específico de RANKL" como se emplea en la presente memoria se referirá a un compuesto, que es un aglutinante de RANKL que neutraliza sustancialmente a RANKL, y/o reduce, o inhibe la unión de RANKL a su receptor RANK, suscitando antagonismo de ese modo de la vía de señalización de RANK-RANKL.

- 15 La función antagónica del agente se caracteriza específicamente por disminuir, inhibir o prevenir una respuesta celular a un receptor (RANK) activado por un agonista (RANKL). Los antagonistas son específicamente antagonistas competitivos, que pueden unirse reversiblemente a RANKL en el mismo sitio de unión o interferir con el sitio de unión (sitio activo), como receptor endógeno, sin activar necesariamente el receptor.

- 20 El agente puede consistir en anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos. En algunas realizaciones, el agente antagónico específico de RANKL es un agente inmunoterapéutico. Un ejemplo específico del agente se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, u osteoprotegerina (que son inactivos o se vuelven inactivos, para evitar la unión agonística de RANKL a su receptor RANK) o una proteína de fusión de receptores, es decir, una proteína de fusión RANK-Fc.

- 25 Los métodos para producir y caracterizar un agente antagónico son bien conocidos en la técnica. En una realización preferida, se producen aglutinantes antagónicos y se escrutan para determinar propiedades predefinidas utilizando uno o más ensayos basados en células. Tales ensayos a menudo implican el control de la respuesta de las células a un aglutinante, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, el cambio en la morfología celular o la activación transcripcional, tal como la expresión celular de un gen natural o un gen informador.

- 30 La producción del agente antagónico del polipéptido recombinante emplea preferiblemente un sistema de expresión para producir el polipéptido recombinante, p. ej. incluyendo construcciones de expresión o vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

- 35 En una realización, el agente antagónico se identifica a través de un procedimiento de descubrimiento de fármacos, tal como la inclusión de un escrutinio que emplea bibliotecas combinatorias (aleatorias o semi-aleatorias) que contienen posibles candidatos a fármacos, p. ej. bibliotecas de péptidos, bibliotecas de anticuerpos o bibliotecas de compuestos químicos. Los escrutinios se pueden realizar en un alto rendimiento utilizando, p. ej., citometría de flujo, y opcionalmente puede discriminar entre interacción de RANK/RANKL activa y no activa o bloqueada. Los escrutinios biológicos pueden tener la finalidad de encontrar nuevos agentes antagónicos dirigidos específicamente a pRANKL.

- 40 Al "reducir o inhibir sustancialmente" la señalización RANK-RANKL, se entiende que el agente antagónico (i) inhibe la unión de RANKL a RANK en más de 50%, preferiblemente más de 60%, 70%, 80%, 90% o 95%, o inhibe completamente tal unión; y/o (ii) inhibe funcionalmente la vía inducida por RANKL, y en particular la señalización después de la estimulación de RANK, p. ej. las actividades de MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) o SRC-quinasas, o señales de NF-κB implicadas en la formación de metástasis, p. ej. según lo determinado en un modelo de pulmón como se describe en la sección de ejemplos a continuación. Tal inhibición funcional es, p. ej., una inhibición de la formación de metástasis en más de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%, o una inhibición completa.

- 45 Alternativamente, se puede determinar la inhibición funcional *ex vivo*, p.ej. determinando la migración de las células cancerosas a través de reordenamientos del citoesqueleto provocados por la activación de Erk1/2 y Src en un ensayo convencional. Específicamente, el potencial de migración e invasión de las células tumorales se puede medir determinando la porción de células que han pasado una barrera que simula una matriz porosa y/o extracelular. Tal inhibición funcional es p. ej. una inhibición de la migración y/o la invasión en más de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%, o una inhibición completa.

- 50 La inhibición funcional también se puede determinar midiendo la regulación por disminución de la firma del gen de la transición epitelio-mesénquima (TEM), en particular los genes asociados a metástasis en células cancerosas dirigiéndose a pRANKL, p. ej. por métodos basados en PCR cuantitativa, determinando cualquiera de E-Cadherina, Claudina, SNAIL o Fibronectina.

El término "anticuerpo" como se emplea en la presente memoria se referirá a polipéptidos o proteínas que consisten en o comprenden dominios de anticuerpo, que se entiende que son dominios constantes y/o variables de las cadenas pesadas y/o ligeras de las inmunoglobulinas, con o sin una secuencia conectora. El anticuerpo como se emplea en la presente memoria tiene un sitio de unión a antígeno específico para unirse al antígeno RANKL o uno o más epítomos de tal antígeno, que comprende específicamente un sitio de unión a CDR de un único dominio de anticuerpo variable, tal como VH, VL o VHH, o un sitio unión de pares de dominios de anticuerpos variables, tales como un par VL/VH, un anticuerpo que comprende un par de dominios VL/VH y dominios de anticuerpos constantes, tales como Fab, F(ab'), (Fab)₂, scFv, Fv, o un anticuerpo completo.

Se pueden utilizar formatos de anticuerpos específicos de acuerdo con la invención, p. ej. un anticuerpo que comprende o consiste en un dominio de anticuerpo variable único, tal como VH, VL o VHH, o combinaciones de dominios de anticuerpos variables y/o constantes con o sin una secuencia de conexión o región bisagra, incluidos pares de dominios de anticuerpos variables, tales como un par VL/VH, un anticuerpo que comprende o consiste en un par de dominios VL/VH y dominios constantes de anticuerpos, tales como anticuerpos de cadena pesada, Fab, F(ab'), (Fab)₂, scFv, Fd, Fv o un anticuerpo completo, p. ej. de un anticuerpo de tipo IgG (p. ej., un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM. El término "anticuerpo completo" se puede utilizar para referirse a cualquier molécula de anticuerpo que comprenda al menos la mayoría del dominio Fc y otros dominios que se encuentran comúnmente en un monómero de anticuerpo natural. Esta frase se utiliza en la presente memoria para enfatizar que una molécula de anticuerpo concreta no es un fragmento de anticuerpo.

El término "anticuerpo" incluirá específicamente anticuerpos en forma aislada, que están sustancialmente libres de otros anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos diana o que comprenden una disposición estructural diferente de dominios de anticuerpos. Aún así, un anticuerpo aislado puede estar comprendido en una preparación combinada, que contiene una combinación del anticuerpo aislado, p. ej. con al menos otro anticuerpo, tal como anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos que tienen diferentes especificidades.

El término "anticuerpo" se aplicará a los anticuerpos de origen animal, incluida la especie humana, tales como de mamíferos, tales como humanos o murinos, o aves, tales como de gallina, cuyo término incluirá particularmente los anticuerpos recombinantes que se basan en una secuencia de origen animal, p. ej. secuencias humanas.

El término "anticuerpo" se aplica adicionalmente a los anticuerpos quiméricos con secuencias de origen de diferentes especies, tales como secuencias de origen murino y humano.

El término "quimérico" como se emplea con respecto a un anticuerpo se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase concreta, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otra especie o clase. Normalmente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamífero, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Por ejemplo, la región variable se puede obtener de fuentes actualmente conocidas utilizando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos anfitriones no humanos combinados con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas.

El término "anticuerpo" se puede aplicar adicionalmente a anticuerpos humanizados.

El término "humanizado" como se emplea con respecto a un anticuerpo se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se obtiene sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en donde la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco (FR) apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo salvaje o modificados, p. ej. por una o más sustituciones de aminoácidos, preferiblemente modificadas para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

El término "anticuerpo" se aplica adicionalmente a los anticuerpos humanos.

Se entiende que el término "humano" como se emplea con respecto a un anticuerpo, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. El anticuerpo humano de la invención puede incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR. Los anticuerpos humanos incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas.

El término "anticuerpo" se aplica específicamente a los anticuerpos de cualquier clase o subclase. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos pueden asignarse a

las principales clases de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término se aplica adicionalmente a los anticuerpos monoclonales o policlonales, específicamente un anticuerpo recombinante, término que incluye todos los anticuerpos y estructuras de anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos originados a partir de animales, p. ej. mamíferos incluidos seres humanos, que comprenden genes o secuencias de diferente origen, p. ej. anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o anticuerpos derivados de hibridomas. Otros ejemplos se refieren a anticuerpos aislados de una célula anfitriona transformada para expresar el anticuerpo, o anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante, combinatoria, de anticuerpos o dominios de anticuerpos, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de anticuerpos a otras secuencias de ADN.

Los dominios de anticuerpos pueden ser de estructura nativa o modificada por mutagénesis o derivatización, p. ej. para modificar las propiedades de unión al antígeno o cualquier otra propiedad, tal como la estabilidad o las propiedades funcionales, tal como la unión a los receptores de Fc FcRn y/o al receptor de Fcγ (FCGR). Se considera que las secuencias polipeptídicas son dominios de anticuerpos, si comprenden una estructura de barril beta que consiste en al menos dos cadenas beta de una estructura de dominio de anticuerpo conectadas por una secuencia de bucle.

Se entiende que el término "anticuerpo" también se refiere a derivados de un anticuerpo, en particular derivados funcionalmente activos, en la presente memoria también se hace referencia a variantes funcionales de anticuerpos. Se entiende que un derivado de anticuerpo es cualquier combinación de uno o más dominios de anticuerpo o anticuerpos y/o una proteína de fusión, en la cual cualquier dominio del anticuerpo puede fusionarse en cualquier posición de una o más proteínas, tales como otros anticuerpos, p. ej. una estructura de unión que comprende bucles de CDR, un polipéptido receptor, pero también ligandos, proteínas de armazón, enzimas, toxinas y similares. Un derivado de anticuerpo se puede obtener por asociación o unión a otras sustancias mediante diversas técnicas químicas, tales como el acoplamiento covalente, la interacción electrostática, la unión di-sulfuro, etc. Las otras sustancias unidas al anticuerpo pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de las mismas (p. ej., PEG, profármacos o fármacos). En una realización específica, el anticuerpo es un derivado que comprende un fármaco, p. ej. para obtener un producto conjugado de anticuerpo-fármaco. Específicamente, el anticuerpo se puede utilizar junto con una etiqueta. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser un derivado que comprende una etiqueta, tal como para fines analíticos o de diagnóstico, incluyendo, p. ej., para su uso como diagnóstico *in vivo*. No hay una limitación específica con respecto a la etiqueta utilizable, en la medida en que no tenga impacto o tenga un impacto negativo tolerable en la unión del anticuerpo a su antígeno diana. Los ejemplos de etiquetas adecuadas incluyen la etiqueta His, la etiqueta Myc, la etiqueta FLAG, la etiqueta Strep, la etiqueta Calmodulina, la etiqueta GST, la etiqueta MBP y la etiqueta S. En otra realización específica, el anticuerpo es un derivado que comprende una marca. El término "marca", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un compuesto o composición detectables que se conjugan directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". La marca puede ser detectable por sí misma, p. ej. marcas radioisotópicas o marcas fluorescentes, o, en el caso de una marca enzimática, pueden catalizar la alteración química de un compuesto sustrato o composición que sea detectable.

El término derivado también incluye fragmentos, variantes, análogos u homólogos de anticuerpos, p. ej. con un patrón de glicosilación específico, p. ej. producido mediante glicoingeniería, que son funcionales y pueden servir como variantes funcionales, p. ej. uniéndose a la diana específica.

El término "diseñado mediante glicoingeniería" con respecto a las secuencias de anticuerpos se referirá a variantes de glicosilación que tienen propiedades inmunogénicas, ADCC y/o CDC modificadas como resultado de la glicoingeniería. Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, poseyendo cada isotipo una matriz distinta de estructuras de carbohidratos unidos a N, que afectan de manera variable al ensamblaje, la secreción o la actividad funcional de las proteínas. Los anticuerpos de tipo IgG1 son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación unido a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos bi-antenarios complejos unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie las funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La eliminación del N-Glicano en N297, p. ej. mediante la mutación de N297, p. ej. a A, o T299 generalmente da como resultado anticuerpos aglicosilados con ADCC reducida.

Las principales diferencias en la glicosilación del anticuerpo se producen entre líneas celulares, e incluso se observan diferencias menores para una línea celular dada que crece en diferentes condiciones de cultivo. La expresión en células bacterianas proporciona típicamente un anticuerpo aglicosilado.

Los anticuerpos pueden estar desprovistos de un radical Fc activo, por lo tanto, o compuestos de dominios de anticuerpos que no tienen un sitio de unión a FCGR, incluyendo específicamente cualquier anticuerpo desprovisto de una cadena de dominios CH2 y CH3, o que comprenden dominios de anticuerpos que carecen de la función efectora de Fc, p. ej. por modificaciones para reducir las funciones efectoras de Fc, en particular para anular o reducir la

actividad ADCC y/o CDC. Tales modificaciones se pueden efectuar por mutagénesis, p. ej. mutaciones en el sitio de unión de FCGR o por derivados o agentes para interferir con la actividad ADCC y/o CDC de un anticuerpo, para lograr la reducción de la función efectora de Fc o la falta de la función efectora de Fc, que normalmente se entiende que se refiere a una función efectora de Fc de menos de 10% de la del anticuerpo no modificado (tipo salvaje), preferiblemente menos de 5%, medida por la actividad ADCC y/o CDC.

Un anticuerpo de la presente invención puede exhibir o no una función efectora de Fc. Aunque el modo de acción está mediado principalmente por la inhibición de la señalización RANKL-RANK en el microentorno de las células tumorales, sin funciones efectoras de Fc, Fc puede reclutar el complemento y ayudar a la eliminación de los agregados de plaquetas-células tumorales diana, de la circulación a través de la formación de complejos inmunitarios.

Los anticuerpos ilustrativos comprenden un fragmento Fc o al menos parte de un fragmento Fc, por ejemplo para mantener el sitio de unión a FcRn, obteniendo así un anticuerpo con una semivida sustancial *in vivo*.

Un ejemplo adicional se refiere a la modificación de un Fc para obtener una reducción de la posible actividad ADCC y/o CDC, p. ej. mediante un cambio de subtipo de IgG1 a IgG2 o por modificaciones para reducir la unión al receptor de Fc, p. ej. mediante E233P y/o L234V y/o L235A y/o D265G y/o A327Q y/o A330A y/o G236, delección y/o A327G y/o A330S en un Fc de IgG1 humana, donde la numeración es según Kabat [Índice EU].

Otros ejemplos se refieren a una modificación para reducir la inmunogenicidad, p. ej. mediante un sitio de glicosilación K.O., tal como N297Q, que proporciona un deterioro de la unión al receptor de lectina.

Un anticuerpo ilustrativo es Denosumab, o una variante funcional o un fragmento de unión a antígeno del mismo, p. ej. incorporado en el marco de una IgG2 o cualquier otro tipo o subtipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, el sitio de unión al antígeno Denosumab o las secuencias de CDR se pueden incorporar a un anticuerpo IgG1, con o sin función efectora de Fc.

Se entiende que el término "anticuerpo" también se refiere a variantes de un anticuerpo, incluyendo anticuerpos con variantes de CDR funcionalmente activas de una secuencia de CDR parental, y anticuerpos de variante funcionalmente activos de un anticuerpo parental. Por ejemplo, las variantes funcionales de Denosumab se pueden diseñar y utilizar como se describe con más detalle en la presente memoria.

Específicamente, una variante de anticuerpo derivada de un anticuerpo de la invención puede comprender al menos una o más de las regiones CDR o variantes de CDR de las mismas (del anticuerpo parental), p. ej. al menos 3 CDR de la región variable de la cadena pesada y/o al menos 3 CDR de la región variable de la cadena ligera, con al menos una mutación puntual en al menos una de las regiones CDR o FR, o en la región constante de la cadena pesada (HC) o cadena ligera (LC), siendo funcionalmente activa, p. ej., uniéndose específicamente al antígeno RANKL.

El término "variante" se referirá concretamente a anticuerpos, tales como anticuerpos mutantes o fragmentos de anticuerpos, p. ej. obtenidos por métodos de mutagénesis, en particular para eliminar, intercambiar, introducir inserciones en una secuencia o región de aminoácidos específica del anticuerpo o derivatizar químicamente una secuencia de aminoácidos, p. ej. en los dominios constantes para diseñar la estabilidad del anticuerpo, la función efectora o la semivida, o en los dominios variables para mejorar las propiedades de unión al antígeno, p. ej. mediante mecanismos de maduración de afinidad disponibles en la técnica. Se puede emplear cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, incluidas las mutaciones puntuales en las posiciones deseadas, p. ej. obtenidas por técnicas de aleatorización. En algunos casos, las posiciones se eligen al azar, p. ej. con cualquiera de los posibles aminoácidos o una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias de anticuerpos. El término "mutagénesis" se refiere a cualquier mecanismo reconocido en la técnica para alterar una secuencia de polinucleótido o polipéptido. Los tipos preferidos de mutagénesis incluyen mutagénesis por PCR propensa a errores, mutagénesis por saturación u otra mutagénesis dirigida al sitio.

El término "variante funcionalmente activa" de un anticuerpo significa una secuencia que resulta de la modificación de esta secuencia (un anticuerpo parental o una secuencia parental) por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos, o derivatización química de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, o nucleótidos dentro de la secuencia de nucleótidos, o en uno o ambos extremos distales de la secuencia, p. ej. en una secuencia de CDR, los 1, 2, 3 o 4 aminoácidos N-terminales y/o C-terminales y/o los 1, 2, 3 o 4 aminoácidos centrales (es decir, en medio de la secuencia de CDR), y cuya modificación no afecta, en particular perjudica, la actividad de esta secuencia. En el caso de un sitio de unión que tenga especificidad para un antígeno diana seleccionado, la variante funcionalmente activa de un anticuerpo todavía tendría la especificidad de unión predeterminada, o sustancialmente la misma actividad biológica, aunque esto podría cambiarse, p. ej. para cambiar la especificidad fina para un epítipo específico, la afinidad, la avidéz, la tasa de Kon o Koff, etc. Por ejemplo, se entiende específicamente que un anticuerpo que ha experimentado maduración de afinidad es un anticuerpo variante funcionalmente activo. Por lo tanto, se entiende que la secuencia de CDR modificada en un anticuerpo que ha experimentado maduración de afinidad es una variante de CDR funcionalmente activa.

Preferiblemente, se utiliza un agente que se une a pRANKL con una alta afinidad, en particular con una alta y/o baja

velocidad de disociación, o una alta avidez de unión. La afinidad de unión generalmente se caracteriza en términos de la concentración del agente, en la cual la mitad de los sitios de unión están ocupados, conocida como la constante de disociación (K_d , o KD). Por lo general, un aglutinante se considera un aglutinante de alta afinidad con una $K_d < 10^{-8}$ M, preferiblemente una $K_d < 10^{-9}$ M, incluso es más preferido una $K_d < 10^{-10}$ M.

5 Sin embargo, en una realización alternativamente preferida, las afinidades de unión a antígeno individuales son de afinidad media, p. ej. con una K_d de menos de 10^{-6} M y hasta 10^{-8} M, p. ej. cuando se une a al menos dos antígenos.

El término "sustancialmente la misma actividad biológica" como se emplea en la presente memoria se refiere a la actividad indicada por sustancialmente la misma actividad que es al menos 20%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 90%, p. ej. al menos 100%, o al menos 125%, o al menos 150%, o al menos 175%, o p. ej. hasta 200% de la actividad determinada para el anticuerpo comparable o principal.

En una realización preferida, la variante funcionalmente activa de un anticuerpo parental

a) es un fragmento biológicamente activo del anticuerpo, comprendiendo el fragmento al menos 50% de la secuencia de la molécula, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, 98% o 99%;

15 b) se obtiene del anticuerpo mediante al menos una sustitución, adición y/o delección de aminoácidos, en donde la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia con la molécula o parte de ella, tal como un anticuerpo de al menos 50% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90%, aún más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, 98% o 99%; y/o

20 c) consiste en el anticuerpo o una variante funcionalmente activa del mismo y adicionalmente al menos un aminoácido o nucleótido heterólogo con respecto al polipéptido o la secuencia de nucleótidos.

En una realización preferida de la invención, la variante funcionalmente activa del anticuerpo de acuerdo con la invención es esencialmente idéntica a la variante descrita anteriormente, pero difiere de su polipéptido o la secuencia de nucleótidos, respectivamente, en que se obtiene de una secuencia homóloga de una especie diferente. Estos se conocen como variantes naturales o análogos.

El término "variante funcionalmente activa" también incluye variantes alélicas naturales, así como mutantes o cualquier otra variante no natural. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli) péptido que se caracteriza por tener una sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos que no alteran esencialmente la función biológica del polipéptido.

30 Las variantes funcionalmente activas se pueden obtener mediante alteraciones de secuencia en el polipéptido o la secuencia de nucleótidos, p. ej. mediante una o más mutaciones puntuales, en donde las alteraciones de secuencia conservan o mejoran una función del polipéptido o la secuencia de nucleótidos no alterados, cuando se utilizan en una combinación de la invención. Tales alteraciones de secuencia pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones (conservativas), adiciones, eliminaciones, mutaciones e inserciones.

35 Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que tienen relacionadas sus cadenas laterales y propiedades químicas. Los ejemplos de tales familias son los aminoácidos con cadenas laterales alcalinas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc.

40 Una mutación puntual se entiende particularmente como la modificación genética de un polinucleótido que da como resultado la expresión de una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos no modificada genéticamente en la sustitución o intercambio, delección o inserción de uno o más aminoácidos individuales (no consecutivos) o dobletes de aminoácidos para diferentes aminoácidos.

45 Las mutaciones puntuales preferidas se refieren al intercambio de aminoácidos de la misma polaridad y/o carga. En este sentido, los aminoácidos se refieren a veinte aminoácidos naturales codificados por sesenta y cuatro codones de tripletes. Estos 20 aminoácidos se pueden dividir en aquellos que tienen cargas neutras, cargas positivas y cargas negativas:

Los aminoácidos "neutros" se muestran a continuación junto con sus respectivos códigos de tres letras y de una sola letra y polaridad:

50 Alanina: (Ala, A) no polar, neutra;

Asparagina: (Asn, N) polar, neutra;

Cisteína: (Cys, C) no polar, neutra;

Glutamina: (Gln, Q) polar, neutra;

Glicina: (Gly, G) no polar, neutra;

Isoleucina: (Ile, I) no polar, neutra;

Leucina: (Leu, L) no polar, neutra;

5 Metionina: (Met, M) no polar, neutra;

Fenilalanina: (Phe, F) no polar, neutra;

Prolina: (Pro, P) no polar, neutra;

Serina: (Ser, S) polar, neutra;

Treonina: (Thr, T) polar, neutra;

10 Triptófano: (Trp, W) no polar, neutro;

Tirosina: (Tyr, Y) polar, neutra;

Valina: (Val, V) no polar, neutra; e

Histidina: (His, H) polar, positiva (10%) neutra (90%).

Los aminoácidos cargados "positivamente" son:

15 Arginina: (Arg, R) polar, positiva; y

Lisina: (Lys, K) polar, positiva.

Los aminoácidos cargados "negativamente" son:

Ácido aspártico: (Asp, D) polar, negativo; y

Ácido glutámico: (Glu, E) polar, negativo.

20 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de anticuerpos y homólogos descritos en la presente memoria se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica específica, después de alinear la secuencia e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar las sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia.

25 Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluidos los algoritmos necesarios para lograr el alineamiento máximo en toda la longitud de las secuencias que se están comparando.

El término "antígeno", como se emplea en la presente memoria de manera indistinta con los términos "diana" o "antígeno diana", se referirá a una molécula diana completa o un fragmento de tal molécula reconocidos por un agente que reconoce específicamente el antígeno, o capaz de unirse específicamente a la diana, tal como un anticuerpo que reconoce el antígeno a través de la unión mediante el sitio de unión del anticuerpo. Específicamente, las subestructuras de un antígeno, p. ej. una estructura de polipéptido o carbohidrato, generalmente denominadas "epítopos", p. ej. los epítopos de células B o epítopos de células T, que son inmunológicamente relevantes, pueden ser reconocidos por tal sitio de unión. El término "epítopo", como se emplea en la presente memoria, se referirá en particular a una estructura molecular que puede constituir completamente un compañero de unión específico o ser parte de un compañero de unión específico a un sitio de unión de un agente como se describe en la presente memoria. Un epítopo puede estar compuesto de un carbohidrato, una estructura peptídica, un ácido graso, una sustancia orgánica, bioquímica o inorgánica o derivados de los mismos y cualquiera de sus combinaciones. Si un epítopo está comprendido en una estructura peptídica, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, generalmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferiblemente de 5 a 40 aminoácidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 10-20 aminoácidos. Los epítopos pueden ser tanto epítopos lineales como conformacionales. Un epítopo lineal está compuesto por un solo segmento de una secuencia primaria de un polipéptido o cadena de carbohidrato. Los epítopos lineales pueden ser contiguos o solapantes. Los epítopos conformacionales están formados por aminoácidos o carbohidratos unidos por el plegamiento del polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal.

30

35

40

45

El antígeno como se describe en la presente memoria es RANKL humano, en particular pRANKL, aunque el aglutinante específico de pRANKL puede reconocer específicamente de manera cruzada sRANKL y/o mRANKL, o tener reactividad cruzada con pRANKL y cualquiera de (o ambos), sRANKL y mRANKL. El pRANKL humano se entiende específicamente como RANKL que se origina a partir de plaquetas de sangre humana (también

denominadas trombocitos), p. ej. un antígeno expresado en la superficie de una plaqueta de sangre humana, preferiblemente por una plaqueta activada, que se puede dirigir con un antagonista que se une a la misma. La plaqueta también puede interactuar con una célula cancerosa (negativa para RANKL) para transformar tal célula cancerosa en una lesión premetastásica, que a su vez es capaz de expresar RANKL. Por lo tanto, el agente antagónico también puede dirigirse a la célula cancerosa que expresa RANKL. El pRANKL se puede separar o desprender de la superficie de la plaqueta y ser inhibido por el agente antagónico como un ligando soluble. pRANKL cuando se expresa en la superficie de las plaquetas, puede diferir de sRANKL en la accesibilidad de los epítomos. El mRANKL puede ser expresado por un tejido o una célula cancerosa, y adicionalmente interactuar con una plaqueta y/u otra célula cancerosa. Otras diferencias estructurales de pRANKL en comparación con otras formas de RANKL o en comparación con RANKL que se originan a partir de células cancerosas y células de otros orígenes como los osteoblastos, pueden ser evidentes después de un análisis exhaustivo de la secuencia de aminoácidos y el patrón de glicosilación de pRANKL.

El término "RANKL" incluye todas las variantes, isoformas y homólogos de especies de RANKL humano que son expresados de forma natural por las células y que se unen a la superficie de las células, p. ej. de plaquetas de sangre humana o células tumorales, o que están presentes como RANKL soluble en la circulación, como se determina en una muestra de sangre periférica.

Los epítomos preferidos de pRANKL se incorporan a la porción extracelular del antígeno RANKL, en particular la porción extracelular del pRANKL o la porción extracelular del RANKL transmembrana, p. ej. un epítomo que es accesible sobre la superficie de las plaquetas o células.

El agente antagónico como se describe en la presente memoria se une a un epítomo de RANKL, lo que conduce a una inhibición sustancial de la unión de RANKL a su receptor RANK, inhibiendo así la ruta de señalización. Dado que RANKL promueve la supervivencia e induce la migración de varias células cancerosas que expresan RANK, el agente antagónico como se describe en la presente memoria interferiría en la proliferación y metástasis de las células cancerosas al prevenir o reducir la migración premetastásica y la agregación de células cancerosas o tumorales.

El término "metástasis" como se describe en la presente memoria se referirá a la propagación de tumores malignos a sitios secundarios, p. ej. alejados de un tumor original o primario. Normalmente, esto implica desprendimiento de células cancerosas de un tumor primario, entrada en la circulación corporal y establecimiento para crecer dentro de los tejidos normales en otras partes del organismo. Se entiende que tal tumor primario como un tumor que crece en el sitio del origen del cáncer. Las enfermedades hematopoyéticas (leucemia, linfomas y mieloma) se consideran diseminadas en el momento del diagnóstico. Sin embargo, también el cáncer hematopoyético puede formar tumores metastásicos. Aunque es poco frecuente, se ha informado sobre la metástasis de cánceres de la sangre y del sistema linfático en los pulmones, el corazón, el sistema nervioso central y otros tejidos. Se entiende que las células tumorales metastásicas son células que tienen la capacidad de producir una metástasis o que ya son parte de un tumor metastásico. Específicamente, las células cancerosas primarias y/o la metástasis a las que se hace referencia en la presente memoria son positivas para RANK, p. ej. según lo determinado por un método inmunohistoquímico convencional o basado en PCR.

Los ejemplos de tumores mesenquimales primarios son los tumores de tejidos blandos, p. ej. que derivan de músculo, tejido fibroso y tejido vascular.

Entre los tumores primarios mesodérmicos y/o ectodérmicos se encuentran el melanoma y/o el ameloblastoma y el tumor primitivo neuro-ectodérmico del pulmón, respectivamente.

Los cánceres primarios y epiteliales representativos incluyen, entre otros, los cánceres de mama, próstata, pulmón, vejiga, útero, ovario, cerebro, cabeza y cuello, esófago, páncreas, gástricos, células germinales y colorrectal.

Las enfermedades tumorales positivas para RANK particularmente importantes son cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de esófago, carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón, cáncer de colon/recto/colorrectal, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, u otras enfermedades asociadas con entidades tumorales positivas para RANK.

Entre los cánceres de sangre se encuentran la leucemia, el linfoma o el mieloma.

Un paciente que sufre de leucemia puede beneficiarse específicamente del tratamiento anti-RANKL como se describe en la presente memoria, ya que la señalización de RANK en las células leucémicas puede p. ej. aumentar su potencial proliferativo y/o alterar su resistencia a la intervención terapéutica contra el cáncer, p. ej. con quimioterapia y/o inhibidores de quinasa.

Los pacientes tratados para el cáncer y tumores primarios a menudo retienen una enfermedad residual mínima relacionada con el cáncer. Es decir, aunque un paciente pueda tener, por medidas clínicas, una remisión completa de la enfermedad en respuesta al tratamiento, puede quedar una pequeña fracción de las células cancerosas que hayan escapado a la destrucción. El tipo y tamaño de esta población residual es un factor pronóstico importante para el tratamiento continuado del paciente.

En ciertas realizaciones, el paciente tiene una enfermedad residual mínima después de la terapia para el cáncer primario (p. ej., quimioterapia, radioterapia y/o cirugía). El agente antagónico como se describe en la presente memoria se combinaría particularmente con terapia citorreductora u otras intervenciones terapéuticas, p. ej. inmunoterapia, para tratar la enfermedad residual mínima, y/o como terapia de mantenimiento, p. ej. como una terapia prolongada o ampliada después del cese de otro tratamiento contra el cáncer. Además, el agente antagónico retrasaría el recrecimiento o la recurrencia del cáncer o tumor, o la recurrencia de la formación de metástasis en la enfermedad metastásica, p. ej. en al menos 1 o más meses.

Las células tumorales metastásicas específicas están diseminando células tumorales que tienden a desarrollar agregados de células tumorales premetastásicos en la circulación, que desencadenan la formación de metástasis en órganos distantes. Sorprendentemente, resultó que las células tumorales positivas para RANK en diseminación se podían agregar a las plaquetas positivas para RANKL en la circulación, induciendo tales agregados la formación de metástasis. Las plaquetas activadas pueden regular por incremento pRANKL y, por lo tanto, estimular RANK sobre las células tumorales y, por lo tanto, hacerlas premetastásicas. Por lo tanto, el paciente con cáncer tratado de manera ventajosa como se describe en la presente memoria padece una enfermedad tumoral o cáncer que se metastatiza principalmente a través de los vasos sanguíneos, y no metastatiza o metastatiza menos a través de los linfáticos.

Se entiende que los agregados de plaquetas-células cancerosas son prometastásicos, o una forma previa de metástasis, en particular tras la activación de las plaquetas para expresar pRANKL. Tal preforma difiere de las metástasis porque los agregados están presentes en la circulación, y aún no crecen a una masa más grande como metástasis en órganos distantes. Hasta este punto, los agregados de plaquetas-células cancerosas prometastásicos se consideran una realización de una enfermedad neoplásica positiva para RANK.

El término "células tumorales en diseminación" como se emplea en la presente memoria se refiere principalmente a células tumorales encontradas en la circulación de un paciente que tiene un tumor. Aunque este término generalmente no incluiría tumores hematológicos en los que la mayoría del tumor se encuentra en circulación, el término "célula tumoral en diseminación" también abarca las células tumorales (pre)metastásicas en un paciente que padece cáncer de la sangre. Los cánceres de la sangre pueden desencadenar el contacto de las plaquetas con las células cancerosas, lo que opcionalmente da como resultado la diseminación de los agregados de contacto de las plaquetas-células cancerosas en la circulación una vez que van a metastatizar. Las células de los cánceres de la sangre adquieren la capacidad de penetrar las paredes de los vasos linfáticos o sanguíneos, después de lo cual pueden circular a través del torrente sanguíneo como células tumorales circulantes (diseminadas) a otros sitios y tejidos del organismo, formando finalmente un tumor clínicamente detectable conocido como implante tumoral metastásico o secundario. Además, la señalización pRANKL-RANK puede desencadenar la progresión de la enfermedad del cáncer de la sangre.

El término "prometastásico" como se emplea en la presente memoria en relación con los agregados de plaquetas-células cancerosas se entiende de la siguiente manera. Las células cancerosas o tumorales y/o las plaquetas pueden ser prometastásicas, es decir, promover la metástasis, debido a la tendencia a la agregación y posteriormente unión de las plaquetas positivas pRANKL a la célula tumoral positiva para RANK, e inicio de la señalización RANK-RANKL. Las interacciones recíprocas entre las células cancerosas y los diversos componentes del microentorno del tumor influyen en la progresión del tumor y en las metástasis, aunque los mecanismos moleculares subyacentes a estos efectos que promueven la metástasis todavía no están bien definidos. La identificación y comprensión de las vías de intercomunicación de cáncer-plaquetas o tumor-plaquetas pueden conducir al desarrollo de terapias dirigidas a pRANKL para prevenir la metástasis en su estadio más temprano, produciendo un mejor resultado para el paciente.

Las "lesiones premetastásicas" se entienden en la presente memoria como una lesión precursora, caracterizada por eventos celulares y moleculares tempranos de diseminación del cáncer que conducen a la creación de un microentorno que promueve la metástasis (nichos premetastásicos). Resultó sorprendentemente que las células tumorales en diseminación causaban metástasis tras el reclutamiento de trombocitos, en particular trombocitos activados que expresaban pRANKL. A través de la interacción con las plaquetas de la sangre, formando opcionalmente agregados de plaquetas-células cancerosas (prometastásicos), y tras la señalización de RANK-RANKL en el microentorno, la célula cancerosa se volvería premetastásica, por lo que cambiaría su apariencia o naturaleza antes de convertirse en metastásica. Por lo tanto, el pRANKL se considera la característica que distingue entre aquellas células que son lesiones premetastásicas o no. El pRANKL es, por lo tanto, una nueva diana de la prevención de metástasis o enfoques para detectar y prevenir la metástasis en su inicio más temprano.

Al reducir los agregados de plaquetas-células cancerosas prometastásicos, el riesgo de formación de metástasis específica de órganos se reduce considerablemente. En particular, esto se refiere a metástasis viscerales o mesoteliales, u órganos diana como el hígado, pulmón, hueso, intestino, piel, músculo, bazo, cerebro o riñón, y en muchos casos sitios diana distintos de huesos. La metástasis visceral en particular se refiere a metástasis en las vísceras, los órganos internos del cuerpo, específicamente aquellos dentro del tórax tales como el corazón o los pulmones o el abdomen, tales como el hígado, el páncreas o los intestinos. La metástasis mesotelial se refiere al crecimiento de células cancerosas dentro o en un mesotelio tal como la pleura y el peritoneo. En particular, las metástasis mesoteliales pueden conducir a la acumulación de líquido en la cavidad rodeada por el mesotelio, en

particular derrame pleural y/o abdominal, p. ej. debido a la reacción inflamatoria y/o al aumento de la permeabilidad del mesotelio afectado causado por las metástasis.

El término "potencial metastásico", como se emplea en la presente memoria, se referirá al potencial para desarrollar una enfermedad residual mínima, la recurrencia de la enfermedad metastásica, el potencial para que el cáncer metastásico progrese rápidamente, o el potencial para que el cáncer metastásico muestre resistencia a una terapia convencional, p. ej. quimioterapia y/o inmunoterapia.

Un potencial metastásico aumentado o alto es indicativo de una propensión a formar metástasis distantes o metástasis en múltiples sitios u órganos, o bien metástasis local, específica de tejido, específica de órgano o específica de sitio. Se indica un alto potencial metastásico en un paciente con cáncer, donde se determina una carga relativamente alta de células tumorales diseminadas en la circulación. En particular, la muestra de sangre periférica de un paciente con cáncer contendría un mayor número de plaquetas detectables que expresan pRANKL, o cualquiera de sRANKL o mRANKL, o conglomerados de células cancerosas y plaquetas, en comparación con un valor de referencia. Los ejemplos de líneas celulares de alto potencial metastásico son MDA-MB-231 (línea celular de carcinoma de mama, derivada del sitio metastásico de un paciente con cáncer de mama positivo para Her2/neu, p. ej., disponible en ATCC (Manassas, Virginia)), o SK-Mel 5 (línea celular de melanoma, derivada del sitio metastásico de un paciente con melanoma maligno, p. ej., disponible en ATCC (Manassas, Virginia)).

En contraste, un bajo potencial metastásico es indicativo de una baja tasa de metástasis o un tumor no metastásico. El cáncer positivo para RANK de bajo potencial metastásico se presentaría solo con una cantidad baja o limitada de células tumorales en la circulación. En particular, la muestra de sangre periférica de un paciente con cáncer contendría solo un número bajo o limitado de plaquetas detectables que expresaran pRANKL, o pRANKL, o conglomerados de células tumorales y plaquetas. Los ejemplos de líneas celulares de bajo potencial metastásico son MCF-7 (línea celular de carcinoma de mama, derivada del sitio metastásico de un paciente con cáncer de mama positivo para Her2/neu, p. ej., disponible en ATCC (Manassas, Virginia)), o SK-BR-3 (línea celular de carcinoma de mama, derivada del sitio metastásico de un paciente con cáncer de mama positivo para Her2/neu, p. ej., disponible en ATCC (Manassas, Virginia)).

Los métodos para analizar las células tumorales en diseminación y evaluar su potencial metastásico *in vivo* e *in vitro* son bien conocidos en la técnica. Tales métodos pueden ser mejorados mediante la determinación específica de la expresión de pRANKL, o determinando el nivel de lesiones premetastásicas, en particular agregados de plaquetas-células cancerosas prometastásicos en una muestra de sangre, o una fracción que contenga plaquetas de los mismos.

El ensayo de pronóstico basado en el método para predecir el potencial metastásico como se describe más detalladamente en la presente memoria, se puede utilizar para determinar si un paciente se trata adecuadamente con un agente, p. ej. un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato para tratar el cáncer u otros trastornos asociados con el cáncer, tales como la enfermedad metastásica. Por ejemplo, tal ensayo se puede utilizar para determinar si a un sujeto le debe administrar un agente quimioterapéutico.

El término "paciente", como se emplea en la presente memoria, se referirá a un mamífero de sangre caliente, particularmente a un ser humano. En particular, el formato de uso médico de la invención o el método de tratamiento respectivo se aplican a un paciente que necesita profilaxis o tratamiento de cáncer, tumor o enfermedad metastásica. El paciente puede sufrir una enfermedad en estadio temprana o en estadio tardío, o bien un paciente predispuesto a tal enfermedad, p. ej. por predisposición genética.

El término "composición farmacéutica" como se describe en la presente memoria se referirá a una composición adecuada para su administración a un ser humano, es decir, una composición que contiene componentes que son farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, una composición farmacéutica comprende un compuesto activo o una sal del mismo junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéutico tal como un tampón o un modificador de la tonicidad.

El agente antagónico de la presente invención se proporciona específicamente en una composición farmacéutica. Se contemplan composiciones farmacéuticas estables que se preparan para el almacenamiento. En realizaciones específicas, el agente que tiene el grado de pureza deseado se mezcla con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, y se proporciona en forma de formulación liofilizada, solución acuosa o emulsión de aceite en agua. Típicamente, tales composiciones comprenden un portador farmacéuticamente aceptable como es conocido y requerido por una práctica farmacéutica aceptable, véase, p. ej., Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (1980) Mack Publishing Co. Los ejemplos de tales portadores incluyen portadores esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, opcionalmente tamponadas con soluciones tampón adecuadas a un pH dentro de un intervalo de 5 a 8.

Es necesario que las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* sean estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos adecuados.

La administración de la composición farmacéutica que comprende el agente para uso como se describe en la

presente memoria es específicamente por la vía sistémica o mediante administración parenteral, p. ej. por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, pero también por vía oral, intranasal, intraóptica, transdérmica, mucosa, tópica (p. ej., geles, bálsamos, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal o intraocular. Las formulaciones ilustrativas que se utilizan para la administración parenteral incluyen aquellas adecuadas para inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril.

En particular, se prefiere la administración intravenosa, p. ej. como infusión intravenosa o como inyección en embolada. Se sabe que el denosumab se administra por vía subcutánea. En la nueva indicación para elegir como diana pRANKL, el agente Denosumab se administraría específicamente de modo que esté disponible en la circulación durante un período de tiempo prolongado, por lo tanto, la ruta subcutánea es específicamente menos preferida o evitada.

La presente invención incluye una preparación farmacéutica, que contiene como sustancia activa el agente antagónico en una cantidad terapéuticamente eficaz.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", utilizado en la presente memoria indistintamente con cualquiera de los términos "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" del agente antagónico como se describe en la presente memoria, es una cantidad o actividad suficiente para, cuando se administra al sujeto, logra resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos, y, como tal, una cantidad eficaz o sinónimo de la misma dependen del contexto en el que se esté aplicando. En el contexto de la enfermedad, se pueden utilizar cantidades terapéuticamente eficaces del agente para tratar, modular, atenuar, revertir o afectar a una enfermedad o afección que se beneficia de una regulación por disminución o una reducción de las lesiones premetastásicas, agregados de plaquetas-células cancerosas, o agregados de células tumorales prometastásicos, p. ej., para prevenir o tratar enfermedades metastásicas. Se pretende que una cantidad eficaz signifique la cantidad de un compuesto que es suficiente para tratar, prevenir o inhibir tales enfermedades o trastornos. La cantidad de agente antagónico que corresponderá a dicha cantidad variará dependiendo de diversos factores, tales como el fármaco o compuesto dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto o el anfitrión que esté siendo tratado, y similares, pero sin embargo puede ser determinada rutinariamente por un experto en la técnica.

Además, un régimen de tratamiento o prevención de un sujeto (un paciente con cáncer) con una cantidad terapéuticamente eficaz del agente antagónico puede consistir en una administración única o, alternativamente, comprender una serie de aplicaciones. Por ejemplo, el agente antagónico se puede administrar al menos una vez al año, al menos una vez cada medio año o al menos una vez al mes. Sin embargo, en otra realización, el agente antagónico se puede administrar al sujeto desde aproximadamente una vez por semana hasta aproximadamente una administración diaria para un tratamiento dado. La duración del período de tratamiento depende de una variedad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, la concentración y la actividad del agente antagónico. También se apreciará que la dosificación eficaz utilizada para el tratamiento o la profilaxis puede aumentar o disminuir en el transcurso de un régimen de tratamiento o profilaxis concreto. Los cambios en la dosificación pueden derivar y ser evidentes de ensayos de diagnóstico convencionales conocidos en la técnica. En algunos casos, puede ser necesaria la administración crónica.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del agente antagónico, tal como la proporcionada a un paciente humano que lo necesite, puede estar específicamente en el intervalo de 0,5-1000 mg, preferiblemente 1-400 mg, incluso más preferido hasta 300 mg, hasta 200 mg, hasta 100 mg o hasta 10 mg, aunque se pueden indicar dosis más altas, p. ej., para tratar afecciones de enfermedades agudas, tal como cuando se prepara para una intervención quirúrgica, o poco después de una intervención quirúrgica, al comenzar el tratamiento en el plazo de 1-7 días después de la cirugía. Las dosis subcutáneas oscilan típicamente de 0,5 y 400 mg.

El término "tratamiento", como se emplea en la presente memoria, siempre se referirá al tratamiento de pacientes con fines profilácticos (es decir, para prevenir una enfermedad o dolencia) o terapéuticos (es decir, para tratar una enfermedad o dolencia). El tratamiento de un paciente será típicamente terapéutico en casos de cáncer. Sin embargo, en el caso de pacientes que padecen una enfermedad primaria, que están en riesgo de progresión de la enfermedad o en riesgo de desarrollar una dolencia secundaria o reacción secundaria, p. ej. que depende de los efectos de señalización de RANK-RANKL, el tratamiento puede ser profiláctico. Tal tratamiento para la profilaxis también se denomina en la presente memoria tratamiento o terapia, p. ej. que emplea una cantidad terapéuticamente eficaz.

En una realización, el agente antagónico es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente, p. ej. como monoterapia modificadora de la enfermedad.

Alternativamente, el agente antagónico se administra combinado con uno o más agentes terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento convencional, p. ej. quimioterapia para el tratamiento de enfermedades malignas.

En una terapia combinada, el agente antagónico se puede administrarse como una mezcla, o concomitantemente con uno o más regímenes terapéuticos, p. ej. antes, simultáneamente o después de una terapia concomitante.

Las propiedades biológicas del agente antagónico se pueden caracterizar *ex vivo* en experimentos con células, tejidos y organismos completos. Como se conoce en la técnica, los fármacos a menudo se prueban *in vivo* en animales, que incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, farmacodinámica, toxicidad de un fármaco, y otras propiedades. Los animales pueden ser referidos como modelos de enfermedad. Los productos terapéuticos a menudo se prueban en ratones, que incluyen, pero no se limitan a, ratones carentes de sistema inmunológico, ratones SCID, ratones con xenoinjerto y ratones transgénicos (incluidos aquellos modificados genéticamente para activar o desactivar la expresión de un gen "knockin" y "knockout"). Tal experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del agente para ser utilizado como un agente terapéutico con la semivida, la función efectora, la actividad apoptótica y la actividad inhibidora de IgG apropiadas. Cualquier organismo, preferiblemente mamífero, puede ser utilizado para la prueba. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, los primates, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y, por lo tanto, se pueden utilizar para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética, farmacodinámica, semivida u otra propiedad del agente. Las pruebas de las sustancias en seres humanos son finalmente requeridas para su aprobación como fármacos, y estos experimentos se contemplan en la presente memoria. Por lo tanto, el agente antagónico de la presente invención se puede probar en modelos animales o en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas. El denosumab es un producto disponible comercialmente con propiedades biológicas bien establecidas, aunque el efecto anti-pRANKL que inhibe las interacciones de una célula cancerosa con los trombocitos resultó ser sorprendente.

El término "específico" con respecto al agente específico de RANKL como se describe en la presente memoria se referirá a una reacción de unión que es determinante del ligando de interés cognado (RANKL) en una población heterogénea de moléculas. Por lo tanto, bajo condiciones designadas, p. ej. en las condiciones del inmunoensayo, el agente que se une específicamente a su diana concreta no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra.

Un sitio de unión específico o un agente específico suele reconocer solo la diana y no reaccionar de forma cruzada con otras dianas. Aún así, el sitio de unión específico puede unirse específicamente a uno o más epítomos, isoformas o variantes de la diana, o puede tener reactividad cruzada con otros antígenos diana relacionados, p. ej., homólogos o análogos.

La unión específica significa que la unión es selectiva en términos de identidad de la diana, afinidad o avidez de unión alta, media o baja, según se seleccione. La unión selectiva generalmente se logra si la constante de unión o la dinámica de unión es al menos 10 veces diferente, preferiblemente la diferencia es al menos 100 veces, y más preferiblemente al menos 1000 veces.

El término "intervención quirúrgica" en la presente memoria también referido como "cirugía" se referirá a una extirpación quirúrgica, p. ej. biopsia, resección o ectomía del tejido que comprende todo o parte de un tumor, en particular un tumor primario tal como un tumor sólido y/o una o más metástasis.

De acuerdo con un ejemplo específico, el efecto de la expresión de RANKL por trombocitos en reposo o activados se probó en un modelo de ratón con metástasis pulmonar. En el sistema humano se pudo demostrar que los trombocitos activados expresaban RANKL a un nivel más alto en comparación con los trombocitos no activados.

Según otro ejemplo, se utilizó una proteína de fusión RANK-Fc (Schmiedel et al. 2013, Cancer Res. 73(2):683-94), que se compone de un receptor humano RANK y Fc de IgG1 humana, y que comprende mutaciones puntuales para reducir su afinidad por el receptor de Fc FcγRIIIa, CD16, que son 233P/L234V/L235A/ΔG236/A327G/A330S (nomenclatura según Kabat, índice UE). Se determinó el efecto de la proteína de fusión RANK-Fc sobre la formación de metástasis en un modelo de ratón con metástasis pulmonar. Se demostró que la neutralización de RANKL por la proteína de fusión RANK-Fc era aproximadamente tan eficaz como el agotamiento de los trombocitos.

Otros ejemplos pueden mostrar que el pRANKL es transferido por las plaquetas a las células tumorales negativas para RANKL, transformando así las células tumorales en positivas para RANKL. También se puede establecer que pRANKL induce eventos TEM prometastásicos en células tumorales, e influye en la migración de células tumorales a través del matrigel. En un modelo de ratón con modificación genética para inactivar la expresión de un gen que modifica condicionalmente para inactivar la expresión de RANKL en megacariocitos y plaquetas, se puede demostrar que, de hecho, pRANKL induce lesiones premetastásicas y la inhibición de pRANKL inhibiría o reduciría la formación de metástasis.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, tales ejemplos son simplemente representativos de los métodos para poner en práctica una o más realizaciones de la presente invención y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión de RANKL por células de melanoma transfectadas con RANKL en un modelo de ratón de metástasis pulmonar

Se utilizaron células B16-F10 de melanoma de ratón que se transfectaron con RANKL humano o la línea celular parental en un modelo de ratón de metástasis pulmonar. La aplicación de células transfectadas, positivas para RANKL, dio como resultado un aumento drástico de la carga metastásica en los pulmones de los animales en comparación con las células parentales (control) (Figura 1). Dado que se sabe que RANKL humano puede estimular RANK de ratón, estos datos sugieren que el aumento de la carga metastásica en ratones que recibieron células tumorales positivas para RANKL se debe a una mejor señalización de RANK en las células tumorales. Esto también está en línea con los estudios de Jones et al. (2006) que muestran una potenciación de la metástasis de células tumorales positivas para RANK tras la estimulación para- y/o autocrina. Este experimento demuestra que proporcionar RANKL para la estimulación de RANK más allá de los niveles disponibles en circunstancias normales aumenta el potencial metastásico. La transfección de RANKL imita la contribución/transferencia de pRANKL a las células tumorales.

Ejemplo 2: Expresión de pRANKL en trombocitos activados

Dado que se sabe que las plaquetas promueven la metástasis tumoral, se realizó un análisis de la expresión potencial de RANKL en la superficie en plaquetas. Si bien se pudieron detectar niveles bajos de RANKL en las plaquetas en reposo, se obtuvo una expresión profunda de RANKL en la superficie después de la activación de las plaquetas con trombina (Figura 2). Por lo tanto, la activación de las plaquetas, que también ocurre con la formación de agregados con células tumorales, da como resultado una rápida regulación por incremento de la expresión de RANKL. RANKL regulado por incremento está disponible para interactuar con, y estimular, RANK en las células tumorales.

Ejemplo 3: Proteína de fusión RANK-Fc

Se preparó la proteína de fusión de inmunorreceptor-Fc que contiene la fracción extracelular del receptor humano RANK y una inmunoglobulina humana G (IgG1) (Figura 3). La proteína de fusión muestra una notable reducción de la afinidad notablemente para el receptor de Fc (FcγRIIIa, CD16) debido a los intercambios de aminoácidos en la porción de IgG1 que prohíbe la unión de la porción Fc a CD16 en condiciones fisiológicas (233P/L234V/L235A/ΔG236/A327G/A330S, Armor et al., 1999, Schmiedel et al., 2013). Esta construcción, a diferencia del Denosumab, muestra una unión a RANKL tanto humano como de ratón y, por lo tanto, es ventajosa para su uso en modelos murinos de neutralización de RANKL (Bossen et al. 2006, J Biol Chem 281(2):13964-71; Kostenuik et al. 2009, J Bone Miner Res 24 (2):182-95).

Ejemplo 4: Efectos de la neutralización de RANKL en un modelo de metástasis pulmonar

Para examinar el papel de pRANKL que se expresa tras la activación (p. ej., después del recubrimiento de células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo) *in vivo*, se aplicó el modelo de metástasis pulmonar de melanoma. Se utilizaron células de melanoma parentales para caracterizar el papel de pRANKL murino fisiológico en este modelo. El número de metástasis se redujo drásticamente con el agotamiento de las plaquetas, lo que también coincide con los informes anteriores. Curiosamente, la neutralización de RANKL murino utilizando proteínas de fusión RANK-Fc-KO dio lugar a un bajo número de metástasis que eran comparables a los resultados obtenidos con el agotamiento de las plaquetas (Figura 4). Estos datos apuntan al hecho de que la metástasis está mediada por pRANKL y que su neutralización puede prevenir la formación de metástasis.

Ejemplo 5: La neutralización de RANKL evita la señalización de TEM prometastásica inducida por plaquetas en células MCF10A inmortalizadas.

Como primera etapa, los autores de la presente invención emplearon PCR cuantitativa en tiempo real para descartar que las células MCF10A, un modelo clásico para el análisis de TEM, expresaran RANKL. Esto sirvió para determinar que la estimulación del RANK expresado en el tumor no se producía de forma autocrina/paracrina independientemente de las plaquetas. Posteriormente, las células MCF10A se incubaron con plaquetas humanas para imitar el recubrimiento de plaquetas de las células tumorales en la sangre como se describió anteriormente (Kopp et al. 2009, Cancer Res 69(19):7775-83; Placke et al. 2012, Cancer Res 72(2):440-8; y Placke et al. 2012, 189(1):154-60). Adicionalmente, se realizaron co-cultivos en presencia o ausencia de Denosumab para neutralizar el RANKL derivado de plaquetas. El análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de la inducción del ARNm de ZEB y N-Cadherina demostró que la presencia de plaquetas inducía la expresión de los dos genes prometastásicos en las células MCF10A. Esto se redujo en gran medida al bloquear RANKL con Denosumab, proporcionando así una clara evidencia de que, de hecho, pRANKL media los efectos prometastásicos de las plaquetas sobre las células tumorales tras la formación de agregados y que la neutralización de pRANKL puede servir para limitar el potencial metastásico de las células tumorales.

Ejemplo 6: La neutralización de RANKL previene la migración inducida por plaquetas de células MCF10A inmortalizadas.

Dado que el potencial migratorio de las células malignas es clave para su capacidad de formar metástasis, los autores de la presente invención estudiaron si RANKL derivado de plaquetas también influía en la migración de las células tumorales. Para este fin, se emplearon células MCF10A en un sistema de ensayo Transwell. Las células MCF10A se incubaron con plaquetas humanas para imitar el recubrimiento de plaquetas de las células tumorales en

la sangre como se describió anteriormente en presencia o ausencia del control de isotipo o Denosumab en la cámara superior de un sistema Transwell. Después de 48 h, se determinó el número de células que habían migrado a la cámara inferior a lo largo de un gradiente de EGF. Los autores de la presente invención observaron que la presencia de plaquetas aumentó claramente el número de células migradas, y esto se redujo en gran medida cuando RANKL derivado de plaquetas fue neutralizado por presencia de Denosumab. Esto demuestra que pRANKL aumenta el potencial migratorio de las células malignas y, por lo tanto, su fenotipo prometastático en la formación de agregados y que la neutralización de pRANKL puede servir para limitar el potencial metastático de las células tumorales (Figura 7).

Ejemplo 7: Modelo de metástasis pulmonar que utiliza ratones modificados genéticamente para inactivar el gen RANKL específico de plaquetas.

Para seguir examinando el papel de pRANKL *in vivo*, se empleó el modelo de metástasis pulmonar de melanoma B16-F10. Para evaluar específicamente el papel de RANKL expresado en plaquetas, se criaron ratones 129-*Tnfsf1*^{tm1.1Caob}/J en los que RANKL contiene sitios flox (en lo sucesivo RANKL fl/fl) y ratones C57BL/6-Tg(Pf4-cre) Q3Rsko/J que contienen una recombinasa específica de megacariocitos/plaquetas (en lo sucesivo denominado Pf4cre) para generar ratones RANKL fl/fl Pf4 cre/+ knockout (ko) en los que RANKL se inactiva específicamente en megacariocitos/plaquetas. Para la determinación de los efectos de RANKL expresado en plaquetas, se inyectaron células de melanoma B16-F10 (75.000 por ratón) a través de la vena de la cola en ratones RANKL fl/fl Pf4 cre/+ knockout (ko) o ratones C57BL/6 de control (ctrl). La carencia de RANKL en las plaquetas dio como resultado una reducción sustancial de metástasis pulmonares en el grupo ko en comparación con el de control (Figura 8). Estos datos confirman adicionalmente la participación específica de pRANKL en la formación de metástasis *in vivo*, y respaldan el enfoque de los autores de la presente invención de que la neutralización de pRANKL puede servir para prevenir la metástasis.

Ejemplo 8: La neutralización de RANKL evita la señalización de TEM prometastática inducida por plaquetas en células de melanoma SK-Mel.

Para confirmar y ampliar los resultados obtenidos con células MCF10A inmortalizadas, los autores de la presente invención emplearon la línea celular de melanoma maligno SK-Mel (ATCC). El análisis de citometría de flujo excluyó que las células malignas expresaran por sí mismas RANKL para determinar que la estimulación de RANK expresado en el tumor no se producía de manera autocrina/paracrina y que en lugar de eso dependía de las plaquetas (Figura 9A). En los experimentos que se muestran en la figura 9B, las células SK-Mel se incubaron con plaquetas humanas para imitar el recubrimiento de plaquetas de las células tumorales en la sangre como se describió anteriormente. Se realizaron co-cultivos en presencia o ausencia de Denosumab (5 µg/ml) para neutralizar RANKL derivado de plaquetas. Después de 24 h, el análisis de PCR cuantitativo en tiempo real de la inducción del ARNm de ZEB demostró que, al igual que con las células MCF10A, la presencia de plaquetas indujo la expresión de este gen prometastático, y esto se redujo en gran medida al bloquear RANKL derivado de plaquetas con Denosumab. También se observaron efectos similares al analizar los niveles de expresión de Twist y Vimentina, dos genes adicionales involucrados en la formación de metástasis/TEM. Estos análisis confirman y amplían los hallazgos de los autores de la presente invención obtenidos con las células MCF10A que se describen en la figura 5 y proporcionan evidencia adicional de que, de hecho, pRANKL media los efectos prometastáticos de las plaquetas sobre las células tumorales en la formación de agregados y que la neutralización de pRANKL puede servir para limitar el potencial metastático de las células tumorales.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Probiocon GmbH

<120> AGENTE ESPECÍFICO DE RANKL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES METASTÁSICAS

<130> PR001P

<160> 3

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencias Artificial

<220>

<223> cadena pesada

<400> 1

ES 2 739 925 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera

10 <400> 2

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg
      20      25      30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
      35      40      45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
      50      55      60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65      70      75      80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
      85      90      95
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
      100     105     110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
      115     120     125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
      130     135     140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145     150     155     160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
      165     170     175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
      180     185     190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
      195     200     205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210     215

```

<210> 3

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu
1      5      10      15

Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala
      20      25      30
Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met
      35      40      45
Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val
      50      55      60
Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser
65      70      75      80
Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn
      85      90      95
Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile
      100     105     110
Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln
      115     120     125
Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys
      130     135     140
Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu
145     150     155     160
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro
      165     170     175
Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
      180     185     190
Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val
      195     200     205
Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
      210     215     220
His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val
225     230     235     240
Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met
      245     250     255
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
      260     265     270
Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu
      275     280     285
Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
290     295     300
Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp
305     310     315

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente antagónico específico de RANKL que reconoce el ligando de receptor-activador para el factor nuclear kappa-B expresado en plaquetas humano (pRANKL), para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer en estadio temprano para reducir los agregados de células cancerosas circulantes premetastásicos en la sangre, en donde el agente se selecciona de grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión RANK-Fc y formas inactivadas de osteoprotegerina.
2. El agente para su uso según la reivindicación 1, que presenta reacción cruzada, que reconoce pRANKL y al menos uno del activador del ligando de receptor-activador para el factor nuclear kappa-B soluble (sRANKL) y un activador unido a membrana del ligando del factor nuclear kappa-B (mRANKL).
- 10 3. El agente para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el agente se une a pRANKL, inhibiendo de ese modo que pRANKL active su receptor sobre las células cancerosas en diseminación.
4. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente se une al monómero o multímero de pRANKL, formando preferiblemente un complejo con pRANKL unido a la superficie de las plaquetas o pRANKL escindido de la superficie de las plaquetas.
- 15 5. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los agregados de células cancerosas circulantes premetastásicos son agregados de plaquetas con células cancerosas.
6. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el paciente con cáncer tiene riesgo de padecer una enfermedad residual mínima, opcionalmente en donde el paciente tiene un nivel detectable de células cancerosas circulantes en una muestra de sangre.
- 20 7. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el paciente padece un tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en tumores epiteliales y tumores mesenquimales, o tumores de origen endodérmico, mesodérmico y/o ectodérmico, o un cáncer transportado por la sangre, tal como la leucemia.
8. El agente para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el paciente padece cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de esófago, carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón, 25 cáncer de colon/recto/colorrectal, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, o leucemia.
9. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tratamiento se combina con una intervención quirúrgica para eliminar al menos parte de un tumor y/o irradiación, y el agente se administra para terapia neoadyuvante o coadyuvante.
- 30 10. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el agente es un anticuerpo humano o humanizado, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión RANK-Fc.
11. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el agente se administra al paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante administración sistémica, preferiblemente mediante infusión intravenosa o inyección en embolada.
- 35 12. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el agente se administra al paciente combinado con una terapia combinada con coadyuvante o neoadyuvante, preferiblemente quimioterapia, terapia con inhibidores de quinasa y/o inmunoterapia.
13. Un método para identificar un agente candidato principal que es eficaz en la prevención o el tratamiento de lesiones premetastásicas en un paciente con cáncer, comprendiendo el método el escrutinio de uno o más agentes de prueba en un ensayo basado en células, que comprende las etapas de:
 - 40 a) proporcionar un cultivo de células cancerosas;
 - b) poner en contacto el cultivo celular con plaquetas de sangre humana en una mezcla de reacción con un agente de prueba; y
 - c) detectar si el agente de prueba
 - i) inhibe la señalización RANK por pRANKL; y
 - 45 ii) disminuye el nivel de unión de las plaquetas a las células cancerosas;

identificando así un agente candidato principal para prevenir o tratar lesiones premetastásicas,

en donde dichos uno o más agentes de prueba se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión RANK-Fc y formas inactivadas de osteoprotegerina.
14. Un método para predecir el potencial metastásico en un paciente con cáncer, que comprende

- a) proporcionar una muestra de sangre periférica o una plaqueta que contenga una fracción de la misma;
- b) determinar la expresión de pRANKL en dicha muestra y compararla con un valor de referencia, siendo la expresión diferencial indicativa de lesiones premetastásicas y de un mayor potencial para desarrollar metástasis distantes.

Fig. 1

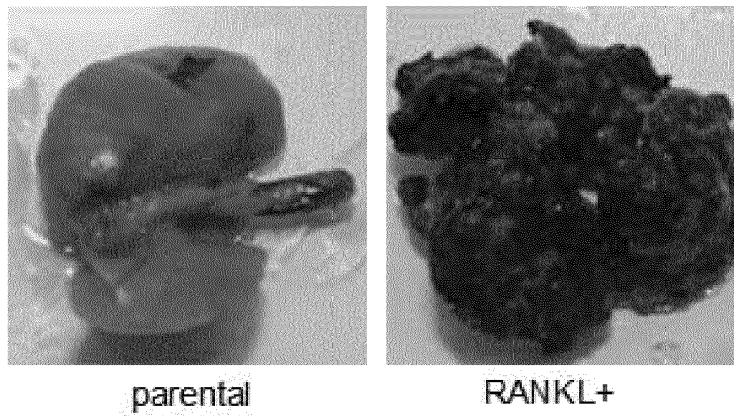


Fig. 2

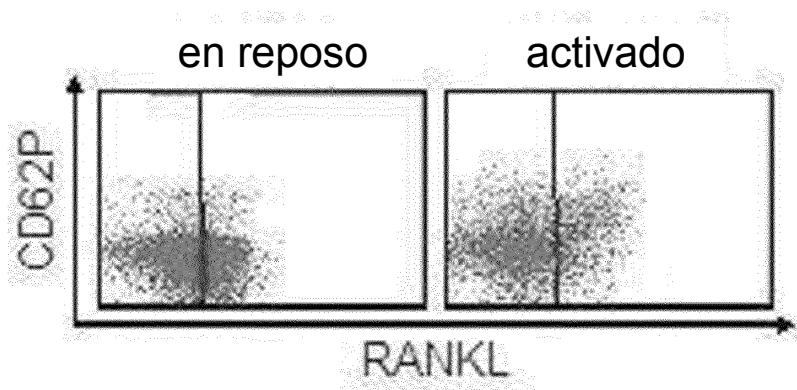


Fig. 3

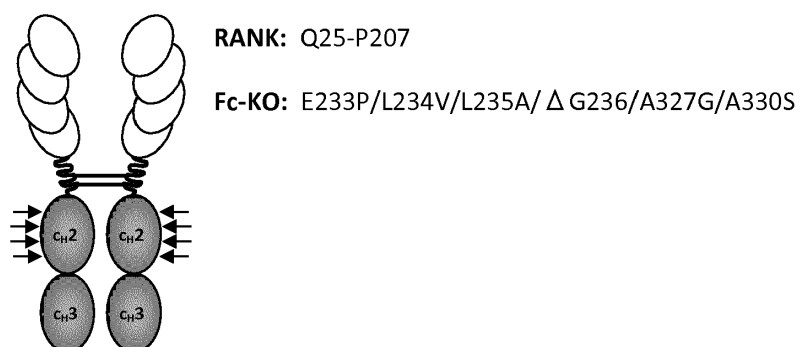


Fig. 4

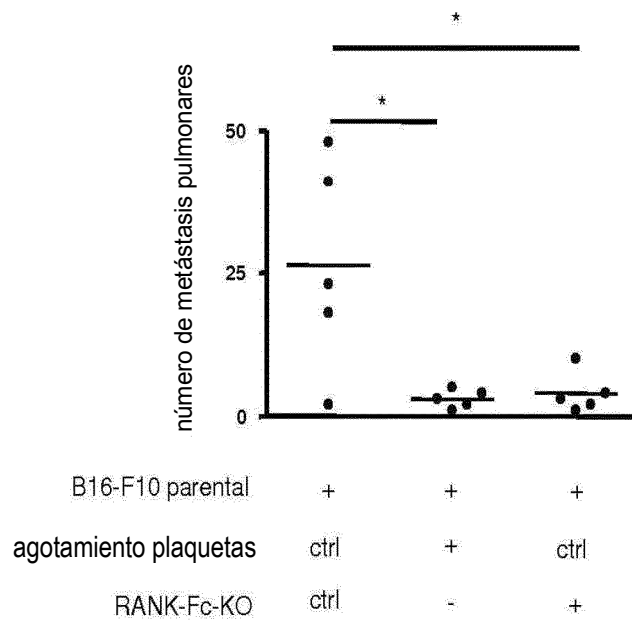


Fig. 5

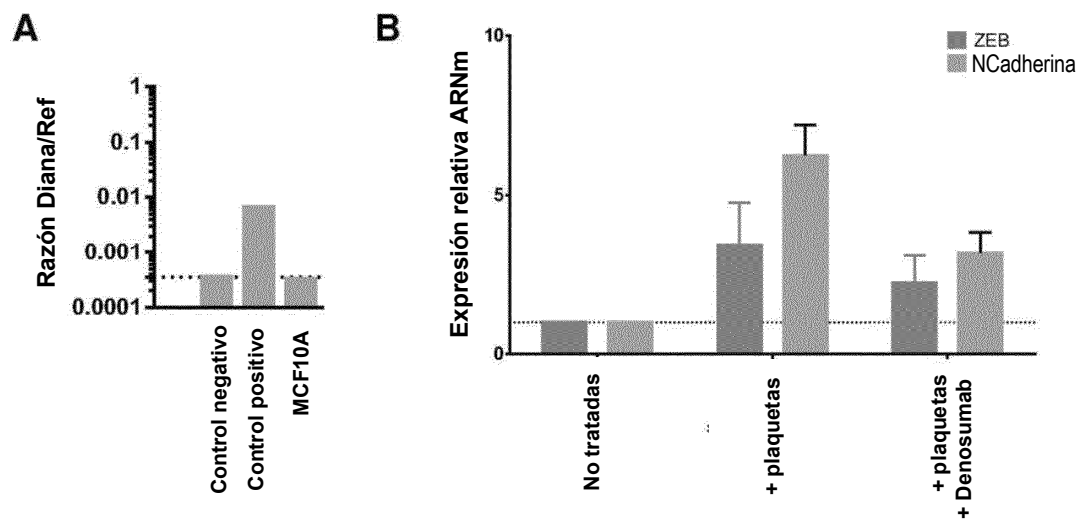


Fig. 6

SEQ ID 1:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID 2:

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYQGSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID 3:

MRRASRDYTKYLRGSEEMGGGPGAPHEGPLHAPPPAPHQPPAASRSMFVALLGLGLGQVVCVALFFYF
RAQMDPNRI SEDGTHCIYRILRLHENADFQDTTLESQDTKLIPDSCRRIKQAFQGAVQKELQHIVGSQHI
RAEKAMVDGSWLDLAKRSKLEAQPFAHLTINATDIPSGSHKVSLSWYHDRGWAKISNMTFSNGKLIVNQ
DGFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWSGNSEFHFYSINVGGF
FKLRSGEEISIEVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVRDID

Fig. 7

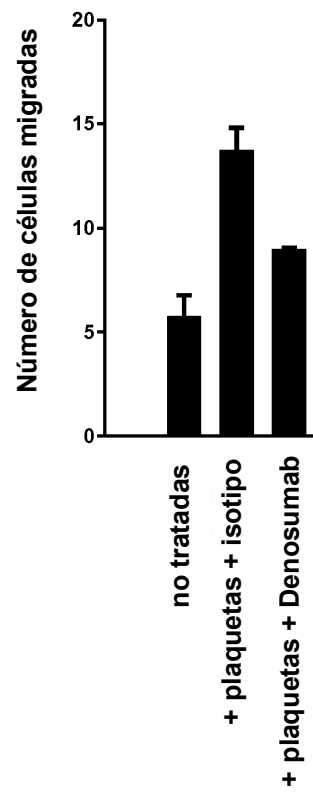


Fig. 8

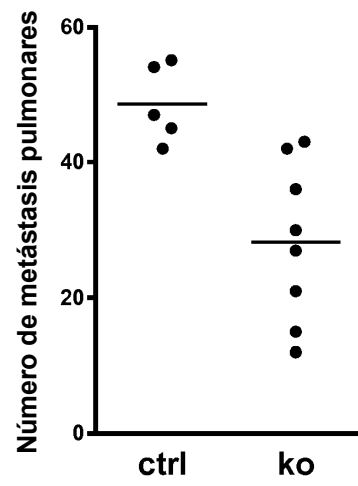
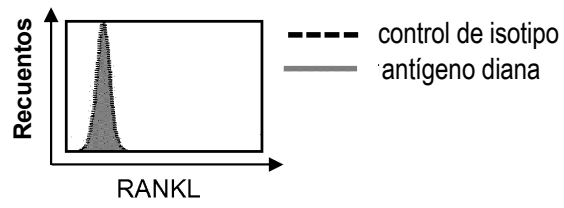


Fig. 9

A



B

