

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 624**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2014 PCT/GB2014/052025**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001345**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2014 E 14741936 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3016682**

54 Título: **Métodos para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

05.07.2013 GB 201312155

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

05.11.2020

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS LTD (100.0%)
The Network Building, 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**WALCZAK, HENNING y
VON KARSTEDT, SILVIA**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 791 624 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para tratar el cáncer

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 [0001] La presente invención se refiere a métodos para tratar a un individuo con cáncer con mutaciones de KRAS mediante la prevención o la interrupción de la unión de TRAIL-R2 a su ligando TRAIL *in vivo*, después de lo cual la neutralización de TRAIL y/o la actividad de TRAIL-R2 reduce la transformación, la migración y la metástasis de células cancerosas, prolongando la supervivencia de los pacientes.

ANTECEDENTES

10 [0002] El ligando inductor de apoptosis (TRAIL) relacionado con el TNF, miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) puede inducir selectivamente la apoptosis en una amplia variedad de células tumorales *in vivo* sin causar toxicidad en las células normales (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). En consecuencia, estos resultados han desencadenado el diseño de tratamientos contra el cáncer con receptores de TRAIL (TRAIL-R) agonísticos (WO 2002094880 A1, US 7915245 B2). Sin embargo, en los últimos años se ha hecho evidente que las células tumorales humanas primarias suelen ser resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL (Todaro et al., 2008) y que el TRAIL también puede inducir la señalización no apoptótica en células cancerosas (Azijli et al., 2013; Newsom-Davis et al., 2009). Por otra parte, en muchos cánceres los TRAIL-R que contienen dominio de muerte, es decir TRAIL-R1 (Pan et al., 1997) (también conocido como DR4) y TRAIL-R2 (Walczak et al., 1997) (también conocidos como KILLER, DR5, TRICK2/TRICK2B, Apo2), los dos receptores que inducen la apoptosis de TRAIL se expresan en niveles más elevados que en el tejido normal (Daniels et al., 2005; Ozawa et al., 2001; Spierings et al., 2003). Teniendo en cuenta que estos dos receptores sirven como dianas terapéuticas para agonistas cuyo propósito es inducir la apoptosis, parecía una coincidencia ventajosa que estos receptores se expresaran en niveles más elevados en muchos tipos de cáncer que en el tejido normal. Sin embargo, esta observación también planteó la cuestión de si podría haber un beneficio aún desconocido e inexplorado para cánceres que expresen estos TRAIL-R de forma significativa.

25 [0003] En un estudio anterior, se demostró en un modelo murino de cáncer de piel inducido por DMBA/TPA, normalmente iniciado por mutaciones oncogénicas del homólogo del oncogén del virus del sarcoma de la rata Harvey (HRAS), que el TRAIL-R murino (mTRAIL-R) actúa como un supresor específico de metástasis en los ganglios linfáticos. El mecanismo propuesto para este efecto fue inducir la muerte celular a través de mTRAIL-R después de la separación de las células cancerosas del tumor primario (Grosse-Wilde et al., 2008). Por el contrario, en otro estudio al que también contribuyó uno de nosotros (H.W.), se demostró que las líneas celulares de cáncer colorrectal humano y murino en las que el homólogo del oncogén del virus del sarcoma de rata Kristen (KRAS) está oncogénicamente mutado, no sólo eran resistentes a la inducción de apoptosis mediada por TRAIL y CD95L, sino que la estimulación mediante estos ligandos aumentó la motilidad y la formación de ondas y protusiones en la membrana en estas células (Hoogwater et al., 2010). La conclusión de este estudio fue que los pacientes con cánceres con mutaciones de KRAS no deben ser tratados con agonistas de TRAIL-R (Hoogwater et al., 2010).

40 [0004] La mutación oncogénica de KRAS es muy frecuente en el cáncer de páncreas (Hidalgo, 2010; Jaffee et al., 2002), frecuente en el cáncer de colon (Grady y Markowitz, 2002) y de pulmón (Mitsuuchi y Testa, 2002) y también ocurre, aunque en frecuencias mucho más bajas, en otros tipos de cáncer tales como tumores malignos del tracto biliar, cáncer endometrial (Ito et al., 1996), cáncer cervicouterino (Wegman et al., 2011), cáncer de vejiga (Przybojewska et al., 2000), cáncer de hígado y colangiocarcinoma (Boix-Ferrero et al., 2000), leucemia mieloide (Ahmad et al., 2009) y cáncer de mama (Karnoub y Weinberg, 2008). Estos son algunos de los cánceres humanos más agresivos, y a pesar de muchos esfuerzos para diseñar tratamientos eficaces para ellos, las tasas de supervivencia de los pacientes con cánceres que tienen mutaciones oncogénicas del gen KRAS son aún muy bajas. En algunos casos, la mutación oncogénica del gen KRAS es incluso un criterio de exclusión para el tratamiento mediante ciertos fármacos, porque se ha descubierto que son ineficaces en estos pacientes (Amado et al., 2008; Deschoolmeester et al., 2010; Karapetis et al., 2008; van Krieken et al., 2008). El comportamiento agresivo de los cánceres con mutaciones del gen KRAS se puede atribuir a su inherente quimiorresistencia, gran capacidad de invasión y capacidad para metastatizar (Downward, 2003), rasgos que hacen que estos cánceres sean muy difíciles de tratar (Chaffer y Weinberg, 2011). Sin embargo, no se han llegado a conocer del todo los mecanismos efectores que median la invasión y la metástasis de los cánceres con mutaciones del gen KRAS y, lo que es más importante, hasta ahora han resistido a la intervención terapéutica.

50 Se apreciará de lo anterior que la provisión de métodos y materiales dirigidos al tratamiento de los cánceres con mutaciones del gen KRAS, o cánceres en los que existen vías o mecanismos patológicos similares, proporcionaría una contribución útil en este campo.

[0005] Hoogwater *et al* describen el K-ras oncogénico, que convierte los receptores de muerte en receptores que promueven la metástasis en células cancerosas colorrectales humanas y de ratones (*Gastroenterology* 2010; 138: 2357-2367). Huang *et al* describen la quimioprevención del cáncer de pulmón mediante la inducción de letalidad sintética en las células premalignas de KRAS mutante *in vitro* e *in vivo* (*Cancer Prev Res*; 4(5) May 2011).
 5 Oikonomou *et al* describen el aumento del número de receptores de TRAIL y la implicación de mutaciones KRAS/BRAF en tumores de cáncer de colon humano (*Int J Cancer*; 125, 2127-2135, 2009). Mérimo *et al* describen la inhibición diferencial de la formación de DR5-DISC mediada por TRAIL por los receptores señuelo 1 y 2 (*Molecular and Cellular Biology*; Oct 2006, p7046-7055). US 7528239 B1 describe proteínas designadas como receptores de TRAIL y secuencias de ADN que las codifican.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0006] Aquí mostramos que el KRAS oncogénico se basa en la interacción de TRAIL endógeno con TRAIL-R2 endógeno para la transformación y la metástasis, identificando la señalización de TRAIL/TRAIL-R2 como un mecanismo efector novedoso requerido para la transformación y la metástasis iniciadas por KRAS. La señal que es responsable de los efectos protumorigénicos de la reticulación del TRAIL-R2 endógeno mediante TRAIL endógeno
 15 no se genera a través de FADD y la caspasa-8, las moléculas de señalización canónica de los TRAIL-R que contienen el dominio de muerte, que se requieren para la inducción de apoptosis mediante estos receptores, y tampoco requiere la actividad de caspasa. En lugar de ello, hemos descubierto que las mutaciones oncogénicas de KRAS inhibe el efector ROCK que, a su vez, permite la activación de Rac1 en el extremo de TRAIL/TRAIL-R2.

[0007] Por lo tanto, a la vista de la descripción de la presente memoria se puede observar que otras alteraciones oncogénicas que resultan en la inhibición de ROCK también pueden permitir la activación Rac1 mediada por TRAIL-R/TRAIL. Además de la mutación de KRAS, la señalización por integrinas a través de Src y FAK (Ahn *et al.*, 2010), BRAF (Klein *et al.*, 2008), Raf-1 (Ehrenreiter *et al.*, 2009) y Notch3 (Belin de Chantemele *et al.*, 2008) se han relacionado con la inhibición de ROCK. Por lo tanto, los cánceres que presentan una señalización aberrante en las vías anteriormente mencionadas también pueden emplear el sistema TRAIL/TRAIL-R2 para potenciar la migración y
 20 la metástasis y, por lo tanto, también deben ser considerados para los tratamientos aquí presentados, es decir, la inhibición de TRAIL, de TRAIL R2, y/o la inhibición de la actividad promigratoria de TRAIL/TRAIL-R2.

[0008] Una forma de lograr esta inhibición es interfiriendo en la interacción de TRAIL con TRAIL-R2. Una forma preferida de lograrlo es con un fármaco bioterapéutico que se una e inhiba TRAIL o un fármaco bioterapéutico que se una a TRAIL-R2 y lo neutralice. Esto se puede lograr mediante la inhibición de la interacción de TRAIL con
 30 TRAIL-R2 por el fármaco, pero también se puede lograr sin la inhibición de esta interacción. Preferiblemente, estos fármacos son de origen completamente humano. De forma alternativa, se podrían emplear fármacos que interfieran con la señalización intracelular de TRAIL/TRAIL-R2 que media los efectos protumorigénicos. Esto podría, p. ej., lograrse con inhibidores de la actividad de Rac1.

[0009] Según se define en la reivindicación 1, la presente invención proporciona un agente para su uso en un método para tratar el cáncer en un individuo con un cáncer con mutación de KRAS, comprendiendo el método la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva del agente, en donde el agente es un compuesto que evita o inhibe a TRAIL unirse a TRAIL-R2 o interrumpe un complejo TRAIL/TRAIL-R2 resultante de dicha unión, en donde el agente es un compuesto seleccionado de la lista que consiste en:

(i) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a TRAIL-R2, neutralizando su actividad; (ii) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TRAIL y lo neutraliza; (iii) una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de un TRAIL-R2, o una parte de este, fusionada a un dominio Fc de anticuerpos humanos, o una parte de este, con o sin la región bisagra del anticuerpo, o una parte de esta, que se une a TRAIL y lo neutraliza. Otros aspectos y realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones subsiguientes. Sin embargo, otras características de la presente descripción se exponen a continuación (y donde estas características estén comprendidas en las reivindicaciones, pueden ser denominadas como características de la invención o similar). La invención está definida por las reivindicaciones independientes.

[0010] La presente descripción proporciona un método para tratar un individuo que padece de cáncer con mutación de KRAS, o un cáncer en el que ROCK está inhibido, con, por ejemplo:

- un agente que neutraliza al TRAIL,
- un agente que neutraliza al TRAIL-R2 (u otro TRAIL-R descrito en la presente memoria) y/o
- un agente que interfiere con la actividad protumorigénica desencadenada por TRAIL y/o TRAIL-R2 (u otro TRAIL-R descrito en la presente memoria).

[0011] "Neutraliza" en este contexto, se entenderá por modular una actividad biológica, ya sea directamente (por ejemplo, uniéndose a la diana relevante) o indirectamente. Como se usa en la presente memoria, el término "actividad biológica" significa cualquier efecto observable resultante de la interacción entre proteína/receptor (parejas de unión). Normalmente, el efecto será uno causalmente relacionado con la transformación, la migración y la

metástasis de células cancerosas. Los ejemplos de actividad biológica representativos, pero no limitativos, en el contexto de la presente invención, incluyen la señalización y regulación de los genes mencionados en la presente memoria, por ejemplo, KRAS oncogénico. Los sistemas adecuados para identificar y confirmar los efectos de tales agentes así como las actividades biológicas relevantes se describen a continuación.

5 [0012] Por ejemplo, según una forma de realización preferida, el agente que neutraliza la actividad de TRAIL y/o TRAIL-R2 reduce el estado de activación de Rac1 en células con mutación de KRAS. Según la presente invención, la actividad de TRAIL sobre TRAIL-R2 puede determinarla una persona entrenada en el uso de un ensayo adecuado como se indica en el Ejemplo 1 (Figura 7).

10 [0013] "Neutraliza" no implica la inactivación completa. La modulación es generalmente inhibición, es decir, una reducción o disminución en la actividad biológica relevante en comparación con la actividad observada en ausencia del agente.

[0014] A continuación, para abreviar, cuando se explican los TRAIL-R, se puede referir específicamente a la realización preferida de TRAIL-R2. Sin embargo, se apreciará que toda mención de este tipo se aplica mutatis mutandis a cualquier otro TRAIL-R, por ejemplo, TRAIL-R1, TRAIL-R3, TRAIL-R4 u OPG.

15 [0015] Por lo tanto, según un aspecto de esta divulgación, se proporciona el uso de agentes que disminuyen la actividad biológica de TRAIL o TRAIL-R en los métodos, o en la fabricación de un fármaco, para el tratamiento de los cánceres descritos en la presente memoria. Tales métodos pueden comprender administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que disminuye la actividad biológica. Los agentes capaces de disminuir la actividad biológica pueden lograr su efecto mediante diversos medios. Por ejemplo, tal agente puede ser uno que (a modo de ejemplo no limitativo) disminuya la expresión del receptor de TRAIL; aumente la desensibilización del receptor de TRAIL o la ruptura del receptor; reduzca la interacción entre TRAIL y sus receptores endógenos; reduzca la señalización intracelular mediada por TRAIL-R; compita con receptores de TRAIL endógenos para la unión de TRAIL; se una a los receptores de TRAIL para bloquear la unión de TRAIL; o se una a TRAIL evitando la interacción con sus receptores. Se prefiere que el agente interacte directamente con un receptor de TRAIL.

20

25

[0016] Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el compuesto se une a y bloquea la actividad de TRAIL-R2 o su ligando TRAIL, o se une a TRAIL-R2/TRAIL y bloquea la formación correcta del complejo endógeno, de modo que ya no puede participar en la señalización intracelular que conduce a la activación de Rac1 y a potenciar la migración y la capacidad de invasión.

30 [0017] En otra realización, el compuesto es un anticuerpo que se une a TRAIL y/o TRAIL-R2 bloqueando su actividad. Los anticuerpos de esta invención pueden ser monoclonales, policlonales, quiméricos, anticuerpos de cadena simple o fragmentos de anticuerpos funcionales. Por lo tanto, esta descripción comprende cualquier agente/inhibidor que neutralice/bloquee a TRAIL-R2 y/o TRAIL y sus respectivas actividades.

35 [0018] Los inhibidores de TRAIL opcionalmente pueden seleccionarse de (sin limitación) un anticuerpo/fragmento de anticuerpo funcional o una molécula de TRAIL-R recombinante soluble (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 u OPG) o una parte de la unión del ligando del mismo o una parte de TRAIL-R modificada para tener una mayor unión de los ligandos, o una molécula pequeña que pueda ser identificada para unirse a TRAIL e interferir con la unión de TRAIL-R.

40 [0019] Preferiblemente, proteínas de fusión basadas en TRAIL-R2 como se describe en los Ejemplos más adelante, p. ej., el Ejemplo 1 (Figura 3) y sus fragmentos, p. ej., una fusión TRAIL-R2-Fc.

[0020] Las moléculas pequeñas preferidas son las que interfieren en la unión con TRAIL-R2/TRAIL, puesto que TRAIL-R2 tiene la afinidad más alta a TRAIL de los cinco TRAIL-R.

[0021] Algunas de estas formas de realización se describirán a continuación con más detalle:

Cánceres

45 [0022] A modo de ejemplo no limitativo, la presente invención se puede aplicar a pacientes con cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer cervicouterino, cáncer de hígado, leucemia mieloide, colangiocarcinoma o cáncer de vejiga con mutación de KRAS. Otros cánceres preferidos se describen más adelante. Los cánceres diana más preferidos son los cánceres de páncreas, colon o pulmón con mutación de KRAS.

50

Anticuerpos

[0023] Para la producción de anticuerpos según la invención, varias especies huésped pueden inmunizarse mediante una inyección con las proteínas anteriormente mencionadas para ser dirigidas o cualquier fragmento de las dos proteínas que son inmunogénicas.

5 [0024] Por ejemplo, los anticuerpos para neutralizar la actividad de TRAIL se pueden generar contra TRAIL humano de longitud completa cuyas secuencias se describen en el Ejemplo 5.

[0025] Se seleccionará un adyuvante apropiado en función de la especie huésped para aumentar una respuesta inmune. Preferiblemente, los péptidos, fragmentos u oligopéptidos utilizados para inducir una respuesta de anticuerpos contra ellos contendrán al menos cinco, pero preferiblemente diez, aminoácidos. Los anticuerpos monoclonales contra las dos proteínas pueden producirse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos o fragmentos funcionales recombinantes y no recombinantes de estos anticuerpos mediante el cultivo de líneas celulares continuas. Estos incluyen, entre otros, la técnica del hibridoma y la técnica del hibridoma de células B humanas. Además, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos, p. ej., anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos resultantes se pueden usar con o sin modificaciones tales como el marcaje, la unión recombinante de tramos de anticuerpos o con moléculas que funcionan como marcadores. Las modificaciones pueden ser covalentes o no covalentes.

10

15

[0026] Se pueden usar muchos inmunoensayos y no inmunoensayos diferentes para el cribado para identificar anticuerpos con la especificidad deseada. Varios protocolos para ensayos de unión e inmunoradiométricos competitivos utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales con una especificidad ya establecida son bien conocidos en el sector de la técnica. Estos inmunoensayos normalmente implican medir la formación de complejos entre TRAIL-R2 o TRAIL y sus anticuerpos específicos. Se prefiere un "sándwich", es decir, un inmunoensayo de base monoclonal de dos caras, que comprenda anticuerpos monoclonales contra dos epítomos de la proteína que no interfieran, pero también se puede usar un ensayo de unión competitiva.

20

[0027] Más específicamente, se prefiere que el anticuerpo sea una γ -inmunoglobulina (IgG). Se apreciará que la región variable de un anticuerpo define la especificidad del anticuerpo y, como tal, esta región debe ser conservada en derivados funcionales del anticuerpo según la invención. Las regiones más allá de los dominios variables (dominios C) tienen una secuencia relativamente constante. Se apreciará que el rasgo característico de los anticuerpos según la invención son los dominios V_H y V_L . Se apreciará, además, que la naturaleza precisa de los dominios C_H y C_L no es, en general, crítica para la invención. De hecho, los anticuerpos preferidos según la invención pueden tener dominios C_H y C_L muy diferentes. Además, los derivados funcionales de anticuerpos preferidos pueden comprender dominios variables sin un dominio C (p. ej., anticuerpos scFV). Un derivado de anticuerpo puede tener una identidad del 75% en la secuencia, más preferiblemente una identidad del 90% en la secuencia y más preferiblemente tiene al menos una identidad del 95% en la secuencia de un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo específico en una mezcla policlonal. Se apreciará que la mayor parte de la variación de la secuencia se puede producir en las regiones marco (FR, del inglés *Framework Regions*), mientras que la secuencia de los CDR de los anticuerpos y sus derivados funcionales es la más conservada.

25

30

35

[0028] Varias formas de realización preferidas de la invención se refieren a moléculas con ambos dominios, variables y constantes. Sin embargo, se apreciará que la invención también engloba fragmentos de anticuerpos (p. ej., anticuerpos scFV) que comprenden esencialmente la región variable de un anticuerpo sin ninguna región constante.

40

[0029] Se sabe que los anticuerpos generados en una especie tienen varios inconvenientes graves cuando se usan para tratar a una especie diferente. Por ejemplo, cuando se usan anticuerpos murinos en los humanos tienden a tener una vida media corta en circulación en suero y son reconocidos como proteínas extrañas por el paciente que está siendo tratado. Esto conduce al desarrollo de una respuesta de anticuerpos humanos anti ratón (o rata) no deseada. Esto es particularmente problemático cuando se requieren administraciones frecuentes del anticuerpo, ya que puede potenciar la eliminación del mismo, bloquear su efecto terapéutico y provocar reacciones de hipersensibilidad. Por consiguiente, los anticuerpos preferidos (si son de origen no humano) se humanizan para su uso en terapias en humanos.

45

[0030] Los anticuerpos monoclonales se generan mediante la técnica de hibridoma que, por lo general, implica la generación de mAbs no humanos. La técnica permite producir anticuerpos monoclonales de roedores con casi cualquier especificidad. Por consiguiente, las realizaciones preferidas de la invención pueden usar esta técnica para desarrollar anticuerpos monoclonales contra los receptores de TRAIL. Aunque tales anticuerpos son útiles terapéuticamente, se apreciará que tales anticuerpos no son agentes terapéuticos ideales en humanos (como se ha sugerido anteriormente). Idealmente, los anticuerpos monoclonales humanos serían la opción preferida para aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, la generación de mAbs humanos usando técnicas convencionales de fusión celular no ha sido muy satisfactoria hasta la fecha. El problema de la humanización puede resolverse, al menos

50

55

parcialmente, modificando anticuerpos que usan secuencias de la región V de mAbs no humanos (p. ej., de roedores) y secuencias de la región C (e idealmente FR de la región V) de anticuerpos humanos. Los mAbs 'modificados' resultantes son menos inmunogénicos en humanos que los mAbs de roedores de los que se derivan y, por lo tanto, son más adecuados para el uso clínico.

5 [0031] Los anticuerpos humanizados pueden ser anticuerpos monoclonales quiméricos, en los que, usando tecnología de ADN recombinante, las regiones constantes de inmunoglobulina de roedor se sustituyen por las regiones constantes de anticuerpos humanos. Los genes quiméricos de cadena pesada y cadena ligera se pueden entonces clonar en vectores de expresión que contengan elementos reguladores adecuados e inducirse en células de mamíferos con el fin de producir anticuerpos totalmente glicosilados. Eligiendo un gen humano adecuado de la
10 región C de cadena pesada para este proceso, la actividad biológica del anticuerpo se puede predeterminar. Tales anticuerpos quiméricos son superiores a los anticuerpos monoclonales no humanos en que su capacidad para activar las funciones efectoras se puede adaptar para una aplicación terapéutica específica reduciendo la respuesta antiglobulina que inducen.

15 [0032] Tales moléculas quiméricas son agentes preferidos para el tratamiento del cáncer según la presente invención. Se puede usar RT-PCR para aislar los genes V_H y V_L de los mAbs preferidos, clonarse y usarse para construir una versión quimérica del mAb que posea dominios humanos.

[0033] La humanización adicional de anticuerpos puede implicar el injerto de CDR o la remodelación de anticuerpos. Tales anticuerpos se producen trasplantando las CDR de las cadenas pesada y ligera de un mAb de roedor (que forman el sitio de unión del antígeno del anticuerpo) en las correspondientes regiones marco de un anticuerpo humano.
20

[0034] Los anticuerpos monoclonales neutralizantes de TRAIL comercialmente disponibles son, por ejemplo, el clon 2E5 de TRAIL antihumano de Enzo (<http://www.enzolifesciences.com/ALX-804-296/trail-human-mab-2e5/>) y el anticuerpo anti-TRAIL [75411.11] (ab10516) de Abcam (<http://www.abcam.com/TRAIL-antibody-75411-11-ab10516.html>).

25 *Fragmentos o proteínas de fusión*

[0035] Agentes como los descritos en la presente memoria pueden estar basados en partes (p. ej., fragmentos solubles) de los receptores de TRAIL, opcionalmente fusionadas a dominios de proteínas heterólogas o combinados con fracciones no proteicas.

30 [0036] En una realización, un inhibidor de TRAIL comprende el dominio extracelular de TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 u OPG, preferiblemente el de TRAIL-R2, o una parte de unión al ligando del mismo, o el dominio extracelular de la secuencia madura de TRAIL-R2 según Walczak et al. (Walczak et al., 1997) y una patente de C.T. Rauch y H. Walczak (US 6569642 B1), que puede fusionarse a un dominio de polipéptido heterólogo, en particular, una parte Fc de una molécula de inmunoglobulina, incluyendo o no la región bisagra o parte de la misma, p. ej., de una molécula de IgG humana, preferiblemente una región Fc de la IgG1, IgG2, IgG3 humana o la IgG4 humana con
35 o sin la región bisagra o una parte de la misma.

[0037] La forma en que las dos partes de la proteína completamente humana se fusionan se puede hacer de una manera que reduzca el potencial de inmunogenicidad de la proteína de fusión resultante como se describe en Walczak (WO/2004/085478; PCT/EP2004/003239: "Improved Fc fusion proteins").

40 [0038] Debido a que hay dos formas de empalme de TRAIL-R2 expresadas y el empalme afecta el dominio extracelular de TRAIL-R2 (Screaton et al., 1997), son conocidos al menos dos dominios extracelulares de TRAIL-R2 con secuencias de aminoácidos diferentes. En una realización, la parte de unión a TRAIL del dominio extracelular de TRAIL-R2 puede venir de cualquiera de estos dos cuando se construyen proteínas de fusión TRAIL-R2 inhibitoras de TRAIL.

45 [0039] Las proteínas de fusión TRAIL-R que se unen a TRAIL y neutralizan su actividad, se pueden producir usando cualquier técnica que proporcione la producción de fragmentos funcionales o de longitud completa de estas proteínas recombinantes y no recombinantes mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, entre otras, la producción de proteínas recombinantes mediante células HEK293T como se describe en el Ejemplo 2.

[0040] Como se describe a continuación, las proteínas resultantes se pueden usar con o sin modificaciones tales como marcado, unión recombinante de tramos de anticuerpos o con moléculas que funcionan como marcadores.
50 Las modificaciones pueden ser covalentes o no covalentes.

Agentes peptídicos

[0041] Se apreciará que los agentes peptídicos o proteicos usados según la invención pueden derivarse de secuencias nativas u originales, y, por lo tanto, incluyen derivados que aumentan la eficacia o la vida media del agente *in vivo*. Ejemplos de derivados capaces de aumentar la vida media de polipéptidos según la invención incluyen derivados peptoides, derivados de los D-aminoácidos e híbridos péptido-peptóide.

5 [0042] Los agentes proteicos y peptídicos según la presente invención pueden someterse a degradación mediante diversos medios (tales como la actividad proteasa en un sitio diana). Tal degradación puede limitar su biodisponibilidad y, por tanto, su utilidad terapéutica. Hay diversas técnicas bien establecidas mediante las que pueden diseñarse y producirse derivados de péptidos que han mejorado la estabilidad en contextos biológicos. Tales derivados peptoides pueden tener una biodisponibilidad mejorada como resultado de una mayor resistencia a la
10 degradación mediada por la proteasa. Preferiblemente, un derivado adecuado para su uso según la invención es más resistente a la proteasa que la proteína o péptido de los que se deriva. La resistencia a la proteasa de un derivado peptóide y la proteína o péptido de los que se derive puede evaluarse mediante ensayos de degradación de proteínas bien conocidos. Los valores relativos de resistencia a la proteasas para el derivado peptóide y el péptido pueden entonces compararse. Los derivados peptoides de proteínas y péptidos según la invención pueden ser diseñados fácilmente a partir del conocimiento de la estructura del receptor según el primer aspecto de la
15 invención o un agente según el cuarto, quinto o sexto aspecto de la invención. Puede usarse software comercial para desarrollar derivados peptoides según protocolos bien establecidos.

[0043] Los retropeptoides, (en los que todos los aminoácidos se sustituyen por residuos peptoides en orden inverso) también son capaces de imitar proteínas o péptidos según la invención. Se espera que un retropeptóide se una en la
20 dirección opuesta en el surco de unión al ligando, en comparación con un péptido o híbrido peptóide-péptido que contenga un residuo peptóide. Como resultado, las cadenas laterales de los residuos peptoides pueden apuntar en la misma dirección que las cadenas laterales del péptido original.

[0044] Otra realización de una forma modificada de péptidos o proteínas según la invención comprende formas de D-aminoácidos. En este caso, el orden de los residuos de aminoácidos está invertido. La preparación de péptidos
25 usando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos disminuye considerablemente cualquier descomposición no deseada de tal derivado mediante procesos metabólicos normales, disminuyendo las cantidades del derivado que se necesita administrar, junto con la frecuencia de su administración.

Ácidos nucleicos

[0045] En otra realización de la presente invención, el inhibidor es una molécula efectora de ácido nucleico.

30 [0046] La molécula efectora de ácido nucleico puede ser ADN, ARN (incluidos ARNip, miARN y ARNhp), APN o una molécula híbrida de ADN-ARN. Estos pueden ser dirigidos específicamente a la disminución de secuencias TRAIL o TRAIL-R (véase, p. ej., Ejemplo 5). El ARNip forma parte de un mecanismo de silenciamiento génico, conocido como ARN de interferencia (ARNi) que resulta en la destrucción específica de secuencia de los ARNm y permite una inactivación dirigida de la expresión génica. El ARNip utilizado en el silenciamiento de genes puede comprender
35 ARN bicatenario de 21 nucleótidos de longitud, típicamente con una protuberancia de 2 nucleótidos en cada extremo 3'. De forma alternativa, se pueden usar ARN en horquilla pequeños (ARNhp) usando secuencias codificantes y no codificantes conectados por un bucle de horquilla. Tanto los ARNip como los ARNhp pueden o bien sintetizarse químicamente e introducirse en células para ARNi transitorio, o expresarse de forma endógena a partir de un promotor para la inhibición a largo plazo de la expresión génica. Las moléculas de ARNip para su uso como un
40 agente según la invención, pueden estar compuestos por ARN bicatenario de 10 a 50 nucleótidos. Preferiblemente, los ARNip para su uso como un agente según la invención, comprenden de 18 a 30 nucleótidos. Más preferiblemente, los ARNip para su uso como un agente según la invención, comprenden de 21 a 25 nucleótidos. Y, más preferiblemente, los ARNip para su uso como un agente según la invención, comprenden 21 nucleótidos. Se apreciará que los ARNip tendrán que basarse en las secuencias según el segundo aspecto de la invención. Las
45 moléculas de ARNip bicatenario preferidas comprenden una cadena codificante de 21 a 25 nucleótidos contiguos de una secuencia de TRAIL o sus receptores unidos a la cadena no codificante complementaria. De forma alternativa, los ARNhp que usan secuencias codificantes y no codificantes se pueden usar como un agente según la invención. Preferiblemente, los ARNhp que usan secuencias codificantes y no codificantes, que pueden emplearse como un agente según la invención, comprenden de 20 a 100 nucleótidos.

50 [0047] En otras realizaciones, el ácido nucleico puede codificar otros agentes de la invención, por ejemplo, las proteínas de fusión descritas en la presente memoria basadas en Trail o los Trail R.

[0048] Este puede ser monocatenario o bicatenario. La molécula efectora de ácido nucleico puede suministrarse directamente como un medicamento (podría ser "desnuda" o, p. ej., en liposomas) y puede expresarse a partir de un
55 retrovirus, adenovirus, herpes o virus vaccinia o plásmidos bacterianos para suministrar secuencias de nucleótidos al órgano, tejido o población celular diana.

[0049] Estos constructos pueden utilizarse para introducir secuencias codificantes o no codificantes no traducibles en una célula.

5 [0050] Sin integración en el ADN, estos vectores pueden continuar produciendo moléculas de ARN hasta su degradación mediante nucleasas celulares. Los sistemas de vectores pueden producir la expresión transitoria durante un mes o más con un vector no replicante, y más tiempo si los elementos de replicación apropiados forman parte del sistema de vector.

10 [0051] Por lo tanto, como es bien conocido en la técnica, los vectores recombinantes pueden incluir otros elementos funcionales. Por ejemplo, los vectores recombinantes pueden diseñarse de tal manera que el vector se replique de forma autónoma en la célula. En este caso, los elementos que inducen la replicación del ADN pueden ser necesarios en el vector recombinante. De forma alternativa, el vector recombinante puede diseñarse de tal manera que el vector y la molécula de ácido nucleico se integren en el genoma de una célula. En este caso, son deseables las secuencias de ADN que favorecen la integración dirigida (p. ej., mediante recombinación homóloga). Los vectores recombinantes también pueden tener ADN que codifique los genes que pueden usarse como marcadores seleccionables en el proceso de clonación. El vector recombinante, además, puede comprender también un promotor o regulador para controlar la expresión del ácido nucleico según se requiera.

Variantes

20 [0052] Dondequiera que se mencionen secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos en la presente memoria (por ejemplo en lo que se refiere a la codificación de las proteínas de fusión u otros agentes), se apreciará por el técnico experto que los derivados funcionales de los aminoácidos y las secuencias de ácidos nucleicos descritos en la presente memoria también están previstos, tales derivados pudiendo tener una secuencia con al menos un 30%, preferiblemente un 40%, más preferiblemente un 50%, e incluso más preferiblemente, un 60% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos/polipéptidos/ácidos nucleicos de cualquiera de las secuencias a las que hace referencia la presente memoria. También se prevé una secuencia de aminoácidos/polipéptidos/ácidos nucleicos con una identidad mayor que preferiblemente el 65%, más preferiblemente el 75%, incluso más preferiblemente el 85%, e incluso más preferiblemente el 90% con cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos/polipéptidos/ácidos nucleicos tiene una identidad del 92%, incluso más preferiblemente una identidad del 95%, incluso más preferiblemente una identidad del 97%, incluso más preferiblemente una identidad del 98%y, más preferiblemente, una identidad del 99% con cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia.

30 [0053] El cálculo del porcentaje de identidad entre las diferentes secuencias de aminoácidos/polipéptidos/ácidos nucleicos puede realizarse de la manera siguiente. En primer lugar, se genera un alineamiento múltiple mediante el programa ClustalX (parámetros por pares: apertura de espacio 10,0; extensión de espacio 0,1; matriz proteínica de Gonnet 250; matriz IUB de ADN; parámetros múltiples: apertura de espacio 10,0; extensión de espacio 0,2; retrasar secuencias divergentes 30%; peso de transición de ADN 0,5; matriz negativa > off; series de matriz proteínica de Gonnet; peso de ADN IUB; parámetros de espacio de proteína; sanciones específicas de residuos > on; sanciones hidrofílicas > on; residuos hidrofílicos GPSNDQERK; distancia de separación de espacio 4; separación del espacio final > off). El porcentaje de identidad se calcula entonces a partir de la alineación múltiple como $(N/T)*100$, donde N es el número de posiciones en las que las dos secuencias comparten un residuo idéntico, y T es el número total de posiciones comparadas. Como alternativa, el porcentaje de identidad se puede calcular como $(N/S)*100$, donde S es la longitud de la secuencia más corta que se está comparando. Las secuencias de aminoácidos/polipéptidos/ácidos nucleicos pueden sintetizarse *de novo*, o pueden ser secuencias de aminoácidos/polipéptido/ácidos nucleicos nativas o su derivado.

45 [0054] Como alternativa, una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar se codificará mediante una secuencia que se hibrida con cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos a las que se hace referencia en la presente memoria o sus complementos en condiciones rigurosas. Con condiciones rigurosas, nos referimos a que el nucleótido se hibrida con ADN o ARN unido al filtro en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C seguido de al menos un lavado en 0,2x SSC/SDS al 0.1% a aproximadamente 5-65 C. Como alternativa, un polipéptido sustancialmente similar puede diferir en al menos 1, pero menos de 5, 10, 20, 50 o 100 aminoácidos de las secuencias de péptidos según la invención.

50 [0055] Debido a la degeneración del código genético, es evidente que cualquier secuencia de ácido nucleico podría variarse o cambiarse sin afectar sustancialmente a la secuencia de la proteína receptora codificada en la misma, para proporcionar una variante funcional de esta. Las variantes de nucleótidos adecuadas son aquellas que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, produciendo por lo tanto un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son aquellas que tienen secuencias homólogas de nucleótidos, pero que comprenden todas o partes de la secuencia, que se alteran por la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares al aminoácido que sustituye, para producir un cambio conservador. Por ejemplo, los aminoácidos

hidrofóbicos pequeños no polares incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina. Los aminoácidos hidrofóbicos grandes no polares incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

[0056] El alineamiento exacto de la proteína o ADN ha sido investigado en detalle por diversos investigadores. De particular importancia es el equilibrio entre el emparejamiento óptimo de las secuencias y la introducción de espacios para obtener tal emparejamiento. En el caso de las proteínas, los medios por los cuales se obtienen los emparejamientos son también de importancia. La familia de matrices PAM (p. ej., Dayhoff, M. et al., 1978, Atlas of protein sequence and structure, Natl. Biomed. Res. Found.) y matrices BLOSUM cuantifican la naturaleza y la probabilidad de sustituciones conservadoras y se utilizan en múltiples algoritmos de alineamiento, aunque otras matrices de alineamiento igualmente aplicables serán conocidas por los expertos en la técnica. El popular programa de alineamiento múltiple ClustalW y su versión de Windows ClustalX (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680; Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) son formas eficaces de generar alineamientos múltiples de proteínas y de ADN.

[0057] Frecuentemente, los alineamientos generados automáticamente requieren alineamiento manual, aprovechando los conocimientos del usuario capacitado sobre la familia de proteínas que se esté estudiando, p. ej., el conocimiento biológico de los sitios conservados principales. Uno de tales programas de edición de alineamiento es Align (<http://www.gwdg.de/~dhepper/download/>; Hepperle, D., 2001: Multicolor Sequence Alignment Editor. Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, 16775 Stechlin, Germany), aunque otros, como JalView o Cinema también son adecuados.

[0058] El cálculo del porcentaje de identidad entre las proteínas se produce durante la generación de alineamientos múltiples mediante Clustal. Sin embargo, estos valores deben ser recalculados si el alineamiento ha sido mejorado manualmente o para la comparación deliberada de dos secuencias. Los programas que calculan este valor para pares de secuencias de proteínas dentro de un alineamiento incluyen PROTDIST dentro del paquete de filogenia PHYLIP (Felsenstein; <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>) usando la opción "Similarity Table" como modelo para sustitución de aminoácidos (P). Para el ADN/ARN, existe una opción idéntica dentro del programa DNADIST de PHYLIP.

[0059] Otras modificaciones en las secuencias de proteínas también están previstas y dentro del alcance de la invención reivindicada, es decir, aquellas que se producen durante o después de la traducción, p. ej., mediante acetilación, amidación, carboxilación, fosforilación, proteólisis o enlace a un ligando.

Composiciones

[0060] La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica, que comprende al menos un agente que se une a TRAIL o TRAIL-R2 o que neutraliza la señalización protumorigénica de TRAIL/TRAIL-R2 (que se basa en la actividad Rac1). La presente descripción también proporciona un método para el tratamiento de pacientes con cáncer con mutación de KRAS o cánceres con KRAS de tipo salvaje pero que han desarrollado otros medios para producir la inhibición de ROCK como se ha descrito en el Ejemplo 1 (Figura 7) y publicado para la señalización por integrinas a través de Src y FAK (Ahn et al., 2010), BRAF (Klein et al., 2008), Raf-1 (Ehrenreiter et al., 2009) y Notch3 (Belin de Chantemele et al., 2008), administrando una de las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente memoria.

[0061] En otra realización preferida, la composición farmacéutica puede comprender agentes activos adicionales para el tratamiento del cáncer y, en particular, cánceres con mutación de KRAS incluyendo cáncer de páncreas, de colon o de pulmón, pero también los cánceres con mutación de KRAS que se producen en otros tejidos, incluyendo los tumores malignos hematológicos.

[0062] Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por separado o en combinación con al menos otro agente, tal como compuestos estabilizadores, que se pueden administrar en cualquier solución vehículo farmacéutica estéril, biocompatible incluyendo, entre otras, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones se pueden administrar a los pacientes por separado o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas. Las composiciones farmacéuticas que se detallan en la presente memoria se pueden administrar por cualquier número de vías incluyendo, entre otras, la oral, la intravenosa, la intramuscular, la intraarterial, la intramedular, la intratecal, la intraventricular, la transdérmica, la subcutánea, la intraperitoneal, la intranasal, la enteral, la tópica, la sublingual o la rectal.

Posologías y regímenes

[0063] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr el propósito previsto. La determinación de una dosis efectiva está dentro de la capacidad del personal cualificado. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular, p. ej., de líneas celulares o en modelos animales, normalmente, pero no exclusivamente, ratones. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Sobre la base de tales experimentos piloto, se pueden determinar las dosis útiles y las vías para la administración en los seres humanos. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a aquella cantidad de ingrediente activo, por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína de la invención o un anticuerpo, que es suficiente para el tratamiento de una condición específica. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como LD50/ED50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que muestran grandes índices terapéuticos. La posología está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La posología varía dentro de este intervalo dependiendo de la posología empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración. El médico determinará la posología exacta a la vista de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La posología y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de la fracción activa o para mantener el efecto deseado. Los factores, que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad (estadio del cáncer), la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la(s) combinación(es) de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas, dependiendo de la vida media y velocidad de eliminación de la formulación particular. Las posologías normales pueden variar de 0,1 a 100,000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporciona una orientación sobre posologías y procedimientos de administración en particular y, generalmente, está disponible para los profesionales sanitarios. Los expertos en la técnica emplean formulaciones diferentes para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. De igual manera, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células y condiciones particulares, como se ha detallado anteriormente.

[0064] En otra realización, la posología preferida de un agente (p. ej., una proteína de fusión TRAIL-R2-Fc) puede ser 20-500 mg dos veces por semana, semanal, cada diez días, quincenal, cada tres semanas o cada cuatro semanas.

[0065] Más preferiblemente, la dosis administrada será de entre 50 mg y 200 mg dos veces por semana, semanal o quincenal.

[0066] En otra realización de esta invención, estas posologías pueden usarse para un anticuerpo que se une y neutraliza a TRAIL u otras proteínas de fusión que contienen los dominios extracelulares de otros TRAIL-R, a saber, TRAIL-R1, -R3, -R4 u OPG.

Politerapias

[0067] En algunas realizaciones los métodos o tratamientos pueden combinarse con otras terapias, ya sean sintomáticas o que modifiquen la enfermedad, p. ej., un segundo agente terapéutico que se crea que muestre un beneficio terapéutico en los cánceres pertinentes.

[0068] El término "tratamiento" incluye la combinación de tratamientos y terapias, en los que se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, secuencial o simultáneamente.

[0069] Por ejemplo, puede ser beneficioso combinar el tratamiento con un agente o compuesto como se ha descrito en la presente memoria con uno o más (p. ej., 1, 2, 3, 4) agentes o terapias adicionales.

[0070] Los ejemplos adecuados de coterapéuticos serán conocidos por los expertos en la técnica sobre la base de la descripción de la presente memoria. Normalmente, el coterapéutico puede ser cualquiera conocido en la técnica que se crea que pueda generar efecto terapéutico en el tratamiento de los cánceres descritos en la presente memoria, p. ej., cánceres oncogénicos relacionados con KRAS.

[0071] Por lo tanto, en una realización de esta invención, el agente o la invención se aplica a un individuo con un cáncer (p. ej., cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer cervical, cáncer de hígado, leucemia mieloide, colangiocarcinoma o cáncer de vejiga) en combinación con una quimioterapia y/o radioterapia estándar que se administra para el cáncer respectivo [p. ej., cisplatino, carboplatino, etopósido, gemcitabina, vinorelbina, paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), doxorubicina, pemetrexed, fluorouracilo (también llamado 5FU), capecitabina, oxaliplatino, irinotecán (camptotecina), uftoral (también llamado tegafur con

uracilo), ácido folínico, ciclofosfamida, epirubicina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, o cualquier combinación de los mismos]

5 [0072] Por lo tanto, en una realización de esta invención, el agente o la invención se aplica a un individuo con un cáncer que tiene una mutación de KRAS y la quimioterapia y/o radioterapia estándar es, p. ej., cisplatino, carboplatino, etopósido, gemcitabina, vinorelbina, paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), doxorubicina, pemetrexed, fluorouracilo (también llamado 5FU), capecitabina, oxaliplatino, irinotecán (camptotecina), uftoral (también llamado tegafur con uracilo), ácido folínico, ciclofosfamida, epirubicina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona o cualquier combinación de los mismos.

10 [0073] Preferiblemente, el cáncer es cáncer de páncreas, colon y pulmón con una mutación de KRAS y la quimioterapia y/o radioterapia estándar es, p. ej., cisplatino, carboplatino, etopósido, gemcitabina, vinorelbina, paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), doxorubicina, pemetrexed, fluorouracilo (también llamado 5FU), capecitabina, oxaliplatino, irinotecán (camptotecina), uftoral (también llamado tegafur con uracilo), ácido folínico o cualquier combinación de los mismos.

15 [0074] La combinación particular queda a criterio del médico que también seleccionaría posologías usando su conocimiento general común y las pautas posológicas conocidas por un médico experto.

20 [0075] Los agentes (es decir, un compuesto como se ha descrito en la presente memoria, más uno o más agentes adicionales) pueden administrarse simultánea o secuencialmente, y pueden administrarse en pautas posológicas que varíen de forma individual y por diferentes vías. Por ejemplo, cuando se administran secuencialmente, los agentes pueden administrarse en intervalos estrechamente espaciados (p. ej., durante un periodo de 5-10 minutos) o a intervalos más largos (p. ej., con 1, 2, 3, 4 o más horas de diferencia, o incluso con periodos de diferencia más largos en caso necesario), siendo la pauta posológica precisa proporcional a las propiedades de los agentes terapéuticos.

25 [0076] Los agentes (es decir, un compuesto como se ha descrito en la presente memoria, más uno o más agentes adicionales) pueden formularse juntos en una forma farmacéutica individual, o de forma alternativa, los agentes individuales pueden formularse por separado y presentarse conjuntamente en forma de un kit, opcionalmente con instrucciones para su uso.

Detección de mutaciones KRAS y kits

30 [0077] La invención puede implicar el cribado de pacientes con mutaciones de KRAS u otras (p. ej., por PCR de una muestra del individuo) con el fin de seleccionarlos o rechazarlos para el tratamiento con los agentes descritos en la presente memoria ("diagnósticos complementarios").

[0078] Un kit de diagnóstico disponible comercialmente para detectar mutaciones en el oncogén KRAS es, por ejemplo, el kit de detección de mutaciones K-Ras TheraScreen™, para la detección de las mutaciones 12Ala, 12Asp, 12Arg, 12Cys, 12Ser, 12Val y 13Asp.

35 [0079] Un kit de diagnóstico para detectar mutaciones en el oncogén KRAS es, por ejemplo, el kit TheraScreen™ KRAS PCR de Qiagen.

40 [0080] Otro, y preferido kit de diagnóstico comercialmente disponible en la presente memoria para identificar mutaciones en el gen KRAS es el cobas™ KRAS Mutation Test de Roche (<http://molecular.roche.com/assays/Pages/cobasKRASMutationTest.aspx>), que es una prueba de PCR en tiempo real que se puede usar para detectar un amplio espectro de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen KRAS, incluyendo las mutaciones 12D, 12V, 12C, 12A, 12S, 12R, 12F, 13D, 13C, 13R, 13S, 13A, 13V, 13I, 61H, 61L, 61R, 61K, 61E y 61P. Se observó que este kit da los mejores resultados en tejidos fijados con formalina (González de Castro et al., 2012).

45 [0081] Para el análisis de mutaciones se usa una muestra de cáncer (tumor) típico que comprende ácido nucleico, que puede ser seleccionada del grupo que consiste en un tejido, una sonda de biopsia, un lisado celular, un cultivo celular, una línea celular, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de piel y similares.

[0082] La presente descripción proporciona además el uso de tales kits de mutación KRAS como prueba diagnóstica acompañante a esta invención, es decir, la neutralización de la actividad de TRAIL y/o TRAIL-R2, reduciendo la transformación, la migración y la metástasis de células cancerosas en pacientes con cáncer con mutación de KRAS.

[0083] La presente descripción incluye, además, el uso de tales kits para determinar la probabilidad de la efectividad del tratamiento mediante los agentes de bloqueo de TRAIL y/o TRAIL-R2 de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más agentes anticancerígenos adicionales, en un paciente mamífero, preferiblemente humano, diagnosticado de cáncer (tal como cánceres con mutación de KRAS descritos en la presente memoria), comprendiendo dicho kit preferiblemente medios para detectar una o más mutaciones en los oncogenes KRAS descritos en la presente memoria.

Sistema de cribado

[0084] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para cribar un agente que module/afecte la actividad biológica de TRAIL o TRAIL-R2 como se describe en la reivindicación 6, método que comprende las etapas de:

- (a) incubar una mezcla que comprende
 - (i) TRAIL-R2 y/o TRAIL o fragmentos funcionales de los mismos
 - (ii) un agente candidato
 bajo condiciones en las que TRAIL o TRAIL-R2, o un fragmento funcional de los mismos tiene una actividad biológica de referencia;
- (b) detectar la actividad biológica de TRAIL o TRAIL-R2 o fragmentos funcionales de los mismos para determinar una actividad en presencia del agente;
- (c) determinar una diferencia entre la actividad biológica en presencia del agente y la actividad biológica de referencia.

[0085] Por tanto, en un aspecto se proporciona un método de cribado de un compuesto para probar si el compuesto tiene o no eficacia para tratar un cáncer descrito en la presente memoria, que comprende:

- (i) exponer células o membranas que comprendan un receptor de TRAIL a un compuesto de prueba durante un período de tiempo predeterminado;
- (ii) detectar la actividad biológica o expresión del receptor de TRAIL; y
- (iii) comparar la actividad o la expresión de los receptores de TRAIL en las células o membranas tratadas con el compuesto en relación con la actividad o expresión que se ha descubierto en las células de control o membranas que no fueron tratadas con el compuesto

en donde los compuestos con eficacia para tratar cánceres como se ha descrito en la presente memoria, disminuyen la actividad o disminuyen la expresión del receptor de TRAIL en relación con los controles.

[0086] La actividad biológica en este aspecto puede ser la unión de TRAIL al receptor; la detección de transducción de señales intracelulares mediada por el receptor; o la determinación de un efecto fisiológico en el extremo. Por "expresión" nos referimos a la detección de la proteína receptora, ya sea en la membrana celular, el retículo endoplasmático o aparato de Golgi; o la detección del ARNm que codifica la proteína receptora.

[0087] Según una realización preferida de un ensayo de este tipo, un agente que cribar evita o reduce la activación de Rac1 mediante TRAIL-R2 o TRAIL.

[0088] Otra realización preferida de un ensayo de este tipo es un agente que interrumpa, evite o reduzca la interacción entre TRAIL y TRAIL-R2 o fragmentos de los mismos, como se ha descrito anteriormente y a continuación en la presente memoria.

[0089] Agentes (o moléculas terapéuticas candidatas) de la presente invención pueden incluir, a modo de ejemplo entre otros, los péptidos producidos por expresión de una secuencia de ácido nucleico apropiada en una célula huésped o usando químicos orgánicos sintéticos, o moléculas pequeñas no peptídicas producidas usando químicos sintéticos orgánicos bien conocidos en la técnica. Los ensayos de cribado pueden automatizarse con el fin de facilitar el cribado de un gran número de moléculas pequeñas al mismo tiempo.

[0090] Como se usa en la presente memoria, el término "compuesto terapéutico candidato" hace referencia a una sustancia que se cree que interactúa con una de las proteínas diana de la invención (o un fragmento de las mismas), y cuya interacción puede evaluarse posteriormente.

[0091] Los compuestos terapéuticos candidatos representativos incluyen "xenobióticos", tales como fármacos y otros agentes terapéuticos, productos naturales y extractos, carcinógenos y contaminantes ambientales, así como "endobióticos", tales como esteroides, ácidos grasos y prostaglandinas. Otros ejemplos de compuestos candidatos que pueden investigarse usando los métodos de la presente invención incluyen, entre otros, toxinas y venenos, epítomos virales, hormonas (p. ej., opioides, péptidos, esteroides, etc.), receptores hormonales, péptidos, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores, lectinas, azúcares, oligonucleótidos o ácidos nucleicos, oligosacáridos, proteínas, moléculas pequeñas y anticuerpos monoclonales.

[0092] Los métodos de cribado pueden ser con células o sin células.

[0093] En una realización preferida, la presente invención proporciona un método de cribado de fármacos que utiliza células huésped eucariotas o procariotas transformadas de forma estable con polinucleótidos recombinantes que expresan la proteína diana de la invención o un fragmento de la misma, preferiblemente en ensayos de unión competitivos. Tales células, ya sea en forma viable o fija, pueden usarse para ensayos de unión estándares. Por ejemplo, el ensayo puede medir la formación de complejos entre una proteína diana y el agente que se está probando, o examinar el grado en que la formación de un complejo entre la proteína diana o un fragmento de la misma y un ligando conocido o pareja de unión es interferido por el agente que se está probando. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos de cribado de fármacos que comprenden poner en contacto dicho agente con la proteína diana de la invención o un fragmento de la misma o una variante de la misma que se encuentra en una célula tumoral y ensayar (i) la presencia de un complejo entre el agente y la proteína diana, fragmento o variante de la misma, o (ii) la presencia de un complejo entre la proteína diana, fragmento o variante y un ligando o pareja de unión. En tales ensayos de unión competitivos la proteína diana o fragmento o variante normalmente se marca. La proteína diana libre, fragmento o variante de la misma se separa de aquellos presentes en un complejo de proteína:proteína y la cantidad de marcador libre (es decir sin formar complejo) es una medida de la unión del agente que se está probando con la proteína diana o su interferencia con la unión de la proteína diana a un ligando o pareja de unión, respectivamente.

[0094] De forma alternativa, un ensayo de la invención puede medir la influencia del agente que se está probando en una actividad biológica de la proteína diana. Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos de cribado de fármacos que comprenden poner en contacto dicho agente con la proteína diana de la invención o un fragmento de la misma o una variante de la misma que se encuentra en una célula tumoral y ensayar la influencia de un agente de este tipo en una actividad biológica de la proteína diana mediante métodos bien conocidos en la técnica. En tales ensayos de actividad la actividad biológica de la proteína diana, fragmento o variante de la misma se controla normalmente mediante la provisión de un sistema indicador. Por ejemplo, esto puede implicar la provisión de un sustrato natural o sintético que genere una señal detectable en proporción al grado en el que actúa la actividad biológica de la molécula diana.

[0095] Se contempla que, una vez que se han dilucidado los compuestos terapéuticos candidatos, se pueden emplear metodologías racionales de diseño de fármacos bien conocidas en la técnica para mejorar su eficacia. El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés o de moléculas pequeñas con las que interactúan (p. ej., agonistas, antagonistas, inhibidores) con el fin de crear fármacos que sean, por ejemplo, formas más activas o estables del polipéptido o que, por ejemplo, mejoren o interfieran con la función de un polipéptido *in vivo*. Según un planteamiento, primero se determina la estructura tridimensional de una proteína de interés, tal como la proteína diana de la invención o, por ejemplo, la proteína diana en el complejo con un ligando mediante cristalografía de rayos X, mediante modelado por ordenador o más típicamente, mediante una combinación de técnicas. Por ejemplo, el experto en la técnica puede usar una variedad de programas de ordenador que ayuden en el desarrollo de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) que actúen como una guía en el diseño de moléculas terapéuticas candidatas nuevas y mejoradas. Con menor frecuencia, la información útil con respecto a la estructura de un polipéptido puede adquirirse mediante el modelado basado en la estructura de proteínas homólogas. Además, los péptidos pueden analizarse mediante análisis de alanina (Wells, *Methods Enzymol.* 202:390-411, 1991), en el que se sustituye secuencialmente cada residuo de aminoácido del péptido por un residuo de alanina y su efecto sobre la actividad del péptido se determina con el fin de determinar las regiones importantes del péptido. También es posible diseñar medicamentos basados en un farmacóforo derivado de la estructura cristalina de un anticuerpo con diana específica seleccionado mediante un ensayo funcional. Además, es posible evitar el uso de la cristalografía de proteínas, generando anticuerpos antiidiotípicos para tal anticuerpo funcional con diana específica, que tengan la misma conformación tridimensional que la proteína diana original. Estos anticuerpos antiidiotípicos pueden usarse posteriormente para identificar y aislar péptidos de genotecas, que a su vez actúan como farmacóforos para su uso posterior en el diseño racional de fármacos.

[0096] Para su uso como un medicamento *in vivo*, los compuestos terapéuticos candidatos así identificados pueden combinarse con un vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica o uno de los muchos otros vehículos útiles bien caracterizados en la técnica médica, y formulados como composiciones como se ha descrito anteriormente.

[0097] Dondequiera que se describa, en la presente memoria, un método de tratamiento que emplea un agente, se entenderá que también se describe un agente para su uso en ese método, así como un agente para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar los cánceres pertinentes. Dondequiera que se describa, en la presente memoria, una composición, se entenderá que también se contempla la misma composición para su uso en los métodos terapéuticos (incluyendo métodos profilácticos), al igual que la composición, para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar los cánceres pertinentes.

[0098] En la presente memoria se citan diversas patentes y publicaciones con el fin de describir y divulgar de forma más completa la invención y el estado de la técnica a la que pertenece la invención.

5 [0099] A lo largo de esta memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto lo requiera de otra forma, se entenderá que la palabra "comprende" y las variaciones tales como "comprenden" y "que comprenden" implican la inclusión de un número entero o etapa indicados o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de enteros o etapas.

10 [0100] Cabe señalar que, las formas singulares "un/una", "uno/una" y "el/la", como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, incluyen a sus referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de tales vehículos y similares.

15 [0101] Los intervalos se pueden expresar con frecuencia en la presente memoria como entre "aproximadamente" un valor particular y/o "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, al utilizar el antecedente "aproximadamente" se comprenderá que el valor particular forma otra realización.

[0102] Cualquier subtítulo en la presente memoria se incluye sólo por conveniencia, y no se debe interpretar como limitante de la descripción en modo alguno.

[0103] La invención se describirá con más detalle con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes. Los expertos en la técnica deducirán otras realizaciones de la invención a la luz de estos.

20 *Breve descripción de las figuras*

[0104]

25 Figura 1| La transformación mediada por KRAS depende de la estimulación autocrina de TRAIL/TRAIL-R2. a, Se transfectaron A549, DLD-1, PancTu 1 y Colo357 con los ARNip indicados y se sometieron a ensayos de migración usando el sistema xCELLigence. b, Se transfectaron seis líneas celulares con mutación de KRAS y cinco líneas celulares con KRAS-WT con los ARNip indicados y se sometieron a ensayos de migración. c, Se transfectaron cinco líneas celulares con mutación de KRAS y KRAS-WT con ARNip, silenciando a KRAS y se sometieron a ensayos de migración. d, Se transfectaron células isogénicas con mutación de KRAS (DLD-1) y KRAS-WT (DKO4) como se indica y se sometieron a ensayos de migración. Se normalizó la migración para controlar las células DKO4 transfectadas. e, Las células A549 se sometieron a la atenuación génica y ensayos de migración indicados. f, Se incubaron células A549 en presencia o ausencia de 100 µg/ml de la proteína Fc receptora recombinante indicada durante experimentos de migración como antes. La migración se normalizó a las células tratadas con PBS. g, Las células A549 transfectadas establemente con el vector, ARNhp de control, ARNhp contra TRAIL-R1 y TRAIL-R2 se sometieron a ensayos de formación de colonias en agar blando. Se determinó la formación de colonias relativas normalizadas a las células infectadas con vectores después de 4 semanas. h, Imágenes representativas de las colonias no teñidas cultivadas en agar blando (200x).
30 Todas las figuras representan las medias de tres experimentos independientes +/- EEM, los puntos individuales representan las medias de tres experimentos de una línea celular. Ctr, Control; TR1, TRAIL-R1; TR2, TRAIL-R2; mut, mutado; WT, de tipo salvaje; ns: no significativo; * P <0,05, ** P <0,01 y *** p <0,0001 prueba de la t de Student (b, c) o ANOVA.

40 Figura 2| Se requiere TRAIL-R2, pero no TRAIL-R1 para la migración de células cancerosas con mutación de KRAS, pero no HRAS. a, Se tiñeron líneas celulares para la expresión en la superficie de TRAIL-R1 a TRAIL-R4. b, Las células se sometieron a las atenuaciones génicas indicadas durante 24h y la proliferación se determinó mediante la incorporación de BrdU después de otra incubación de 24h. c, Se sometieron células A549 a una atenuación génica transitoria de TRAIL-R2 usando secuencias individuales ARNip (n.º 1-4), o un grupo que consistía en estas cuatro secuencias, y se sometieron a ensayos de migración usando el sistema xCELLigence. d, Las células A549 infectadas con vector vacío o los ARNhp dirigidos a TRAIL-R1 o TRAIL-R2 se sometieron a ensayos de migración xCELLigence. e, Las células DT8082 (murinas) se sometieron a las atenuaciones génicas indicadas seguido de ensayos de migración como antes. f, Células DT02 (murinas) se sometieron a la migración como en e. Se muestran resultados del análisis Western Blot representativos.
45 Todos los valores representan la media +/- EEM de tres experimentos independientes o un experimento representativo de tres (a). Ctr, Control; ns: no significativo; * P <0,05; ** P <0,01 y *** p <0,0001 prueba de la t de Student (e, f) o ANOVA.

50 Figura 3| Las células con mutación de KRAS requieren la migración autocrina mediada por TRAIL-R2 para la formación de metástasis. a, Se inyectaron 2 x 10⁶ células A549-luc infectadas con shTRAIL-R2 o vector de control

en la vena de la cola de ratones SCID beige. Después de tres semanas se detectó carga metastásica en los pulmones mediante cuantificación de la bioluminiscencia (fotones/segundo). Se muestran tres ratones representativos de cada grupo (n= 9/grupo). b, c Cinco pulmones de cada grupo que estaban más cerca del valor medio de grupo respectivo en la cuantificación con hematoxilina y eosina se sometieron a tinciones adicionales con Ki67 y TUNEL y se cuantificaron como área positivas de Ki67 y TUNEL dentro de los nódulos tumorales, respectivamente. Se muestran imágenes representativas. d, Se inyectaron células parentales A549-luc como en a, los ratones se trataron con vehículo (PBS) o 0,5 mg TRAIL-R2-Fc por ratón a partir del día siguiente, 3x por semana. La bioluminiscencia se determinó después de 2 semanas, se muestran los ratones representativos (n= 8/grupo). Las flechas indican las células positivas en Ki67/TUNEL. Los puntos representan los pulmones individuales. Los valores son medias +/- EEM; ns: no significativo; * P < 0,05 prueba de la t de Student.

Figura 4| Se requiere TRAIL-R2 endógeno para la metástasis pulmonar experimental. a, Las secciones de parafina teñidas con hematoxilina y eosina de pulmones de todos los ratones se sometieron a un análisis microscópico, estimando el porcentaje de área pulmonar total ocupado por el tejido tumoral. Se muestran imágenes representativas. Las flechas indican los focos metastásicos. b, Después de que se alcanzara el punto final experimental, se extrajeron los pulmones. Se muestran fotografías de todos los pulmones. c, Las células A549-luc con ARNhp infectadas indicadas se sembraron en los números de células indicados y se sometieron a ensayos de actividad de luciferasa *in vitro*. d, 2 x 10⁶ células A549-luc con ARNhp infectadas indicadas se inyectaron en la vena de la cola de ratones SCID beige. Después de 1 semana, se detectó la carga metastásica en los pulmones mediante la cuantificación de la bioluminiscencia (fotones/segundo) utilizando el sistema IvisSpectrum Imaging. Se muestran imágenes de tres ratones representativos de cada grupo. e, Se inyectaron 1,5 x 10⁶ células A549-luc establemente infectadas con shTRAIL-R2 o vector de control por vía subcutánea en ambos costados de ratones SCID beige (n= 10 tumores/grupo). Los volúmenes tumorales se midieron con un calibrador después de tres semanas. f, Se muestran los tumores subcutáneos de ambos grupos. g, Pauta de tratamiento para la metástasis de pulmón de ratones SCID (A549) beige. Los datos representan la media +/- EEM de tres experimentos independientes. Los puntos representan ratones individuales/pulmones/tumores de ratones (n = 9/grupo) +/- EEM. ns: no significativo; * P <0,05 (prueba de la t de Student).

Figura 5| La formación de PanIN iniciada por KRAS y la metástasis espontánea de PDAC dependen genéticamente de mTRAIL-R. a, Se extrajeron los páncreas de ratones KC de 4,5 meses de edad, se fijaron, se tiñeron con hematoxilina y eosina y el número de PanINs por sección pancreática se determinó mediante un examen histopatológico (KC-mTRAIL-Rwt/wt (cuadro negro) n= 8 y KC- mTRAIL-Rfl/fl (cuadro blanco) n= 7). b, Tinciones representativas con hematoxilina y eosina, α CK19 y DAPI que muestran PanINs (200x). c, Supervivencia (Kaplan-Meier) de KPC-TRAIL-Rwt/wt (círculos sólidos) y ratones KPC-TRAIL-Rfl/fl (círculos transparentes). d, Se cuantificaron los animales con metástasis en el momento de la muerte. e, Se muestran tinciones con hematoxilina y eosina representativas de adenocarcinomas de páncreas y tejidos del pulmón (100x), Met= metástasis. Los valores son medias +/- EEM * P <0,05 prueba de la t de Student (a); se determinaron los datos estadísticos por el método de Kaplan-Meier mediante la prueba del orden logarítmico p= 0,0096 (c), prueba exacta de Fisher (d, ratones con metástasis, p= 0,0476).

Figura 6| Validación del modelo de ratón KPC en presencia o ausencia de mTRAIL-R. a, El genotipado mediante PCR y una detección mediante PCR de un producto de recombinación se realizaron en ambos, un ratón representativo KPC-TRAIL-Rwt/wt y uno KPC-TRAIL-Rfl/fl; T= cola; E= oreja; P= páncreas. b, Se muestra un ratón KPC representativo con ascitis y tumor de páncreas grande. c, Se determinó el tamaño de los tumores de páncreas sólidos en el momento de la muerte (TOD) usando un calibrador (KPC-TRAIL-Rwt/wt (bloque negro) n= 6; KPC-TRAIL-Rfl/fl (bloque blanco) n= 5). Los datos representan la media +/- EEM. Fl, alelo flojado; Wt, alelo de tipo salvaje; Rec, alelo recombinado; ns: no significativo; (Prueba de la t de Student).

Figura 7| La migración autocrina es independiente de DISC, pero requiere Rac1. a, Los clones 10, 41 y 50 deficientes de FADD fueron transfectados con los ARNip indicados y se sometieron a ensayos de migración. b, Las células A549 infectadas con vector de control o infectadas con shTRAIL-R2 se fijaron y tiñeron utilizando faloidina de acoplamiento rojo Texas y DAPI. Se muestran imágenes confocales representativas (x400). c, Se trataron células A549 con DMSO, PD98059 (10 μ M), PIK75 (100 nM) o NSC23766 (100 μ M) y se sometieron a ensayos de migración. d, Se transfectaron células A549 con los ARNip indicados y se sometieron a ensayos de migración. e, Se trataron células DLD-1 y DKO4 isogénicas con iz-TRAIL (100 ng/ml) durante los tiempos indicados y se sometieron a continuación a la extracción de Rac1 unido a GTP usando esferas Pak1 (kit de activación Millipore-Rac1). f, Las células KRAS-WT DKO4 fueron transfectadas con los ARNip indicados y tratadas con vehículo (H₂O) o 10 μ M Y27632 antes de la migración. Se muestran los resultados del análisis Western Blot representativos. Todos los valores son medias +/- EEM de tres experimentos independientes. Los puntos individuales representan los resultados de las mediciones de un único clon que se muestran como una media de tres experimentos independientes; Ctr, Control; TR2, TRAIL-R2; mut, mutado; WT, de tipo salvaje; ns: no significativo; * P<0,05, ** P <0,01 y *** p<0,0001 prueba de la t de Student (a) o ANOVA.

Figura 8| Se requiere TRAIL autocrino para la migración independiente de la caspasa y la activación de Rac1. a, Se transfectoron células DLD-1 con los ARNip indicados y se sometieron a ensayos de migración. b, Se trataron células A549 con DMSO o 10 μ M zVAD-fmk y posteriormente se sometieron a ensayos de migración. c, Las células DLD-1 que sobreexpresan FADD (dnFADD) dominante negativo se transfectoron con los ARNip indicados y se sometieron a ensayos de migración. d, Las células parentales y células DLD-1 que sobreexpresan dnFADD se trataron con 1 μ g/ml iz-TRAIL durante los tiempos indicados, posteriormente se lisaron y se sometieron a análisis de Western Blot. e, Las células A549 fueron tratadas con iz-TRAIL (100 ng/ml) durante los tiempos indicados y se sometieron a la extracción de Rac1 unido a GTP usando esferas PAK1 (kit de activación Millipore-Rac1). Los lisados celulares se analizaron posteriormente mediante pruebas de Western Blot. f, Células A549 infectadas con control o shTRAIL-R2 se sometieron a la extracción de Rac1 unido a GTP como en e. g, Las células A549 se transfectoron con los ARNip indicados y se sometieron a ensayos de migración. h, Líneas celulares con mutación de KRAS (DLD-1, HCT116) y KRAS-WT isogénicas (DKO4, Hkh-2) se lisaron y se sometieron a pruebas de Western Blot. i, Las células H460 con mutación de KRAS se transfectoron con los ARNip indicados. 48h después de la transfección, las células se lisaron y se sometieron a pruebas de Western Blot. j, Las células KRAS-WT H522 se transfectoron con los ARNip indicados, se trataron con vehículo (H₂O) o 10 μ M Y27632 y se sometieron a ensayos de migración.

El asterisco indica una franja inespecífica. Se muestran pruebas de Western Blot representativas. Todas las figuras muestran las medias de tres experimentos independientes +/- EEM; Ctr, Control; ns: no significativo; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ prueba de la *t* de Student (b) o ANOVA.

Ejemplo 1: La transformación mediada por KRAS requiere TRAIL/TRAIL-R2 endógeno

[0105] La mutación oncogénica de KRAS es una característica de algunos de los cánceres humanos más agresivos (Hidalgo, 2010; Jaffee et al., 2002; Mitsuchi y Testa, 2002; Phipps et al., 2013). El comportamiento agresivo de los cánceres con mutación de KRAS se puede atribuir a su inherente quimiorresistencia, gran capacidad de invasión y capacidad de metastatizar (Downward, 2003), rasgos que hacen que estos tipos de cáncer sean muy difíciles de tratar (Chaffer y Weinberg, 2011). Sin embargo, los mecanismos efectores que median la capacidad de invasión y la metástasis de los cánceres con mutación de KRAS no se acaban de entender y, lo que es más importante, hasta ahora no se han sometido a intervención terapéutica. Aquí mostramos que el KRAS oncogénico se basa en TRAIL/TRAIL-R2 endógeno para la transformación. Todo el aumento de migración proporcionado por el KRAS oncogénico frente al de tipo salvaje (WT) se neutralizó por la ausencia de TRAIL-R2. *In vivo*, la ausencia de TRAIL-R2 de células tumorales o la inhibición sistémica de TRAIL redujo significativamente la metástasis experimental de células cancerosas con mutación de KRAS. En un modelo autóctono de la neoplasia intraepitelial de páncreas (PanIN) iniciada por KRAS, la delección restringida a células de cáncer de TRAIL-R murino (mTRAIL-R) produjo una reducción sustancial de la formación de PanIN. Notablemente, la depleción genética de mTRAIL-R restringida a células cancerosas anuló casi por completo la metástasis y produjo un aumento notable en el tiempo de supervivencia global de los ratones que desarrollaron adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) iniciado por *KRAS/p53* autóctono. Desde el punto de vista farmacodinámico, la señalización de TRAIL/TRAIL-R2 endógeno cooperó con la mutación de KRAS para activar Rac1 y, en consecuencia, la migración y la metástasis. Por lo tanto, hemos identificado la señalización de TRAIL/TRAIL-R2 como un mecanismo efector nuevo requerido para la transformación y la metástasis iniciadas por KRAS. Es importante que esta vía sea susceptible de intervención terapéutica, por ejemplo, por inhibición de TRAIL. Por lo tanto, podemos anticipar que, sobre la base de nuestros hallazgos, se pueden concebir nuevas terapias para el cáncer con mutación de KRAS.

Resultados

[0106] El aumento de la migración y la resistencia a la apoptosis son características de la transformación celular en el cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011). Las células de cáncer colorrectal con mutación de KRAS son resistentes a la inducción a la apoptosis y presentan un aumento de la migración cuando se exponen a TRAIL exógeno (Hoogwater et al., 2010). Curiosamente, muchos cánceres expresan constitutivamente altos niveles de TRAIL-R1, TRAIL-R2 y TRAIL (Daniels et al., 2005; Ganten et al., 2009; Macher-Goeppinger et al., 2009; Ozawa et al., 2001; Sanlioglu et al., 2007; Spierings et al., 2003), y la transformación mediada por Ras ha demostrado coincidir con una mayor expresión de TRAIL-R1 y TRAIL-R2, entre muchos otros genes (Bild et al., 2006). Sin embargo, actualmente se desconoce si la transformación oncogénica por mutación de KRAS y la elevada expresión de los TRAIL/TRAIL-R están relacionadas casual y funcionalmente.

[0107] Para probar esta hipótesis, primero comparamos el efecto de la supresión de la expresión TRAIL-R1 o TRAIL-R2 en la migración en un panel de líneas celulares de cáncer con mutaciones KRAS oncogénicas endógenas (Figura 1a) que expresaron todas TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (Figura 2a). Ni el silenciamiento de TRAIL-R1 ni de TRAIL-R2 tuvo ningún efecto discernible sobre la proliferación de las líneas celulares analizadas (Figura 2b). Sin embargo, la atenuación génica transitoria o estable de TRAIL-R2 endógeno (Figura 2c, d), pero no de TRAIL-R1, disminuyó significativamente la migración de todas las líneas celulares de cáncer con mutación de KRAS analizadas, independientemente del tejido de origen (Figura 1a y Figura 2c, d).

[0108] Dado que los TRAIL-R endógenos también se expresan en las líneas celulares KRAS-WT, determinamos la capacidad migratoria, con y sin TRAIL-R2 o mTRAIL-R (el homólogo murino para ambos TRAIL-R humanos con un dominio de muerte, es decir, TRAIL-R1 y TRAIL-R2 humano (Wu et al., 1999)), en un panel de líneas celulares de cáncer que tenían KRAS mutado o WT. Notablemente, las células cancerosas que expresan KRAS oncogénicos migraron significativamente menos cuando se suprimió la expresión de TRAIL-R2 endógeno o mTRAIL-R (Figura 1b; para la lista de líneas celulares y efectos específicos sobre la migración en cada una de ellas, véase la Tabla complementaria 1). Sorprendentemente, el efecto supresor de la atenuación génica de TRAIL-R2 en la migración fue casi idéntico al efecto de la atenuación génica de KRAS (Figura 1c), y la atenuación génica de mTRAIL-R redujo sustancialmente la migración de una línea celular de cáncer de páncreas murino con mutación de KRAS (DT8082) en más del 90%, pero no de una línea celular murina generada a partir de un carcinoma de piel inducido por DMBA/TPA que contenía una mutación activadora en el codón 61 de HRAS (DT02) (Grosse-Wilde et al., 2008) (Figura 2e,f). Por otro lado, en el modelo mTRAIL-R de carcinoma de piel inducido por DMBA/TPA, iniciado por HRAS, no promovió la metástasis, sino que la suprimió a través de su función proapoptótica (Grosse-Wilde et al., 2008). En conjunto, esto sugiere que el KRAS oncogénico, pero no el HRAS, involucra específicamente el TRAIL-R2/mTRAIL-R endógeno para mediar en la migración.

[0109] Para probarlo, utilizamos un modelo establecido de líneas celulares isogénicas de carcinoma de colon que contenían KRAS mutado o WT (Shirasawa et al., 1993). Notablemente, todo el aumento de migración proporcionado por el KRAS oncogénico dependía del TRAIL y TRAIL-R2 endógeno, ya que la atenuación génica de TRAIL-R2 endógeno suprimió la migración en la misma medida que la ausencia de KRAS oncogénico (Figura 1d), y la atenuación génica de TRAIL (Figura 1e) o su inhibición usando una proteína de fusión TRAIL-R2-Fc suprimió la migración en un grado similar (Figura 1f).

[0110] Una vez que las células cancerosas pierden contacto con el tumor primario, tienen que sobrevivir de manera independiente (Hanahan y Weinberg, 2011). La atenuación génica estable de TRAIL-R2, pero no TRAIL-R1, redujo significativamente la formación de colonias en agar blando (Figura 1g). Además, las colonias formadas por células con una atenuación génica estable de TRAIL-R2 mostraron un fenotipo menos invasivo (Figura 1h). Por lo tanto, todos los rasgos de la transformación celular mediados por KRAS necesarios para la metástasis que se pueden determinar *in vitro* parecen depender de TRAIL/TRAIL-R2 autocrino.

[0111] A continuación, nos propusimos evaluar *in vivo* la relevancia de estos hallazgos con respecto a un posible papel de TRAIL/TRAIL-R2 endógeno en la migración autónoma de las células y la metástasis de cánceres con mutación de KRAS. Para ello, primero empleamos un modelo de metástasis experimental utilizando la línea celular A549-luc de cáncer humano con expresión normal o suprimida de TRAIL-R2. La supresión de TRAIL-R2 endógeno produjo una reducción drástica de la carga metastásica como se determinó mediante las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* (Figura 3a), la inspección histológica (Figura 4a) y la reducción general del tamaño de pulmón (Figura 4b), sin afectar a la actividad de la luciferasa (Figura 4c). Debido a que este efecto ya era discernible después de una semana (Figura 4d), y debido a que la ausencia de TRAIL-R2 de las células que formaron la metástasis (Figura 3c) no afectó ni a la proliferación (Figura 3b) ni a la muerte celular, concluimos que se requiere TRAIL-R2 para una etapa temprana en la cascada metastásica de las células de cáncer con mutación de KRAS. Esto fue corroborado más tarde por el hallazgo de que la ausencia de TRAIL-R2 (Figura 4e, f) no afectó al crecimiento subcutáneo de células A549-luc. En conjunto, estos resultados apuntan hacia la disminución de la capacidad de invasión y la migración, en lugar de la disminución de la proliferación, como causante de la metástasis reducida cuando la señalización de TRAIL/TRAIL-R2 se anula en este modelo. Es importante destacar que, empezar el tratamiento con la proteína de fusión TRAIL-R2-Fc inhibidora de TRAIL 1 día después de la inyección de las células A549-luc (Figura 4g) redujo significativamente la metástasis (Figura 3d) en un grado similar al logrado mediante la supresión estable de TRAIL-R2 (Figura 3a). Por lo tanto, TRAIL y TRAIL-R2 endógeno no sólo promueven rasgos clave oncogénicos de células de cáncer con mutación de KRAS *in vitro*, sino también su capacidad de formar metástasis *in vivo*.

[0112] A continuación, tratamos de resolver si el TRAIL/TRAIL-R endógeno también afectaba al desarrollo y la progresión del cáncer iniciado por KRAS autóctono en etapa temprana y tardía. El KRAS está mutado en el 95% de los PDAC (Hidalgo, 2010; Jaffee et al., 2002) y una línea celular con mutación de KRAS derivada de tumores pancreáticos de ratones KRAS^{G12D}xp53^{R172H}xPDX-1-Cre (KPC) empleó mTRAIL-R para la migración (Figura 2e). Por lo tanto, nos propusimos determinar cómo la deficiencia de mTRAIL-R (Grosse-Wilde et al., 2008), específicamente en las células de cáncer, afectaba al cáncer de páncreas. En primer lugar, estudiamos el efecto de la depleción genética de mTRAIL-R en la formación PanIN iniciada por KRAS en un modelo de ratón que recapitula la etapa temprana del desarrollo del cáncer de páncreas [ratones KRAS^{G12D}xPDX-1-Cre (KC)] (Hingorani et al., 2003). Descubrimos que la ausencia específica de mTRAIL-R de las células pancreáticas transformadas por KRAS redujo notablemente el número de PanINs que se desarrollaron en estos ratones (KC-mTRAIL-R^{fl/fl}) en comparación con los controles de la misma camada (KC mTRAIL-R^{wt/wt}) (Figura 5a, imágenes representativas mostradas en 5b). Por lo tanto, mTRAIL-R promueve la formación de PanIN mediada por KRAS, la lesión precursora del cáncer de páncreas.

[0113] Para investigar el papel de mTRAIL-R en un modelo de ratón que recapitula estrechamente el espectro completo del cáncer de páncreas humano, hicimos uso del modelo de ratón KPC de metástasis PDAC. Este modelo

utiliza la expresión condicional de KRAS^{G12D} y p53^{R172H} activada por la recombinasa Cre iniciada por el promotor PDX-1 que genera un patrón de mosaico de la expresión combinada de KRAS^{G12D}/p53^{R172H} en el páncreas adulto, induciendo de este modo PDAC metastásico (Hingorani et al., 2005). Los alelos floxados mTRAIL-R se recombinaron con éxito en los páncreas, pero no en las colas o las orejas, de ratones KPC-mTRAIL-R^{fl/fl} (Figura 6a). Estos ratones nacieron con las proporciones mendelianas esperadas y presentaron una carga tumoral significativa a partir de las 5 semanas de edad (datos no mostrados). La ausencia de mTRAIL-R de cánceres de páncreas con mutación doble KRAS/p53 aumentó drásticamente la longitud de vida de estos ratones (Figura 5c) de una media de 112 días para ratones KPC mTRAIL-R^{wt/wt} a 162 días para ratones KPC mTRAIL-R^{fl/fl}. Al final del experimento, todos los ratones presentaban distensión abdominal, debido a los grandes tumores de páncreas y, en algunos casos, ascitis (Figura 6b). En el respectivo momento de la muerte, el tamaño de los tumores de páncreas era comparable entre los dos grupos (Figura 6c), lo que se esperaba porque los ratones KPC mTRAIL-R^{fl/fl} vivieron significativamente más tiempo, dando más tiempo a los tumores primarios a desarrollarse y crecer. Sin embargo, sorprendentemente, todos los ratones KPC que expresaban mTRAIL-R en sus células tumorales presentaron metástasis en pulmón en el momento de la muerte mientras que todos menos uno de los ratones mTRAIL-R^{fl/fl} KPC no tenían metástasis en la necropsia (Figura 5d, se muestran imágenes representativas en la Figura 5e), a pesar de vivir, como promedio, 50 días (es decir, 44%) más que los ratones con tumores que expresaban mTRAIL-R. Esto demuestra que el hecho de no metastatizar en ausencia de mTRAIL-R no es una consecuencia de los tumores primarios más pequeños en el momento de la muerte, sino que se inhabilita específicamente por la ausencia de mTRAIL-R endógeno de cáncer de páncreas iniciado por KRAS.

[0114] Anteriormente mostramos que en el carcinoma de células escamosas de la piel iniciado por HRAS, mTRAIL-R es un supresor de la metástasis por su función inductora de apoptosis (Grosse-Wilde et al., 2008). Por lo tanto, dependiendo del contexto oncogénico que puede favorecer la señalización apoptótica o protumorigénica del sistema TRAIL/TRAIL-R endógeno, se puede suprimir o promover la metástasis.

[0115] A continuación, resolvimos qué vía en el extremo mTRAIL-R/TRAIL-R2 podría ser responsable de aumentar la capacidad migratoria de las células cancerosas con mutación de KRAS y, en consecuencia, aumentar la metástasis. En primer lugar, nos centramos en los FADD y la caspasa-8, ya que son los componentes centrales de la señalización canónica de TRAIL, ya que son cruciales tanto para el complejo de señalización (DISC) de TRAIL que induce a la muerte (Sprick et al., 2000) como para un complejo secundario que se forma posteriormente al DISC (Varfolomeev et al., 2005). No obstante, ni la atenuación génica de la caspasa-8 ni la inhibición de la pan-caspasa afectaron significativamente la migración de células cancerosas con mutación de KRAS (Figura 8a, b). Además, ni la sobreexpresión de FADD funcional dominante negativo (dnFADD) (Figura 8c, d), ni la delección genética de FADD en tres clones independientes de células A549 evitó la reducción de la migración por la atenuación génica de TRAIL-R2 (Figura 7a). Por lo tanto, la migración mediada por TRAIL/TRAIL-R2 autocrina es independiente de FADD y la caspasa-8. Debido a que FADD es también la proteína adaptadora para la caspasa-10 y cFLIP (Kischkel et al., 2000; Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2002; Sprick et al., 2000), estos resultados implican que la migración mediada por TRAIL/TRAIL-R2 autocrina también es independiente de estos factores.

[0116] Al inspeccionar la morfología de las células con expresión TRAIL-R2 suprimida establemente, observamos que presentaban una morfología más redondeada y menos forma de lamelipodio que las células de control (Figura 7b). Sorprendentemente, se sabe que la pequeña GTPasa Rac1 es necesaria para la formación del lamelipodio, que se activa predominantemente por KRAS en comparación con HRAS (Walsh y Bar-Sagi, 2001), y la inhibición de Rac1 disminuye el número y tamaño de colonias cultivadas en agar blando (Gao et al., 2004), que recuerda la ausencia de TRAIL-R2 (Figura 1g, h). Además, se demostró recientemente que la formación de PanIN iniciada por KRAS depende de la reorganización de actina mediada por Rac1 sin afectar a la proliferación (Heid et al., 2011). Por lo tanto, a continuación, probamos si Rac1, en comparación con otras vías de KRAS efectoras, sería necesaria para mediar la migración autónoma de células de una manera dependiente del TRAIL/TRAIL-R2. Debido a que sólo la inhibición de Rac1, pero no de MEK o PI3 α , produjo una reducción significativa en la migración similar a la atenuación génica de TRAIL-R2 (Figura 7c), investigamos a continuación si el TRAIL podría activar potencialmente a Rac1. De hecho, el TRAIL fue capaz de activar Rac1 en células A549 (Figura 8e), y la activación basal de Rac1 se redujo en ausencia de TRAIL-R2 endógeno (Figura 8f). El hecho de que la atenuación génica de Rac1, además de la atenuación génica de TRAIL-R2, no produjera una reducción adicional de la migración (Figura 7d), indica que Rac1 y TRAIL-R2 forman parte de una vía única promigratoria, en lugar de vías paralelas que pueden compensarse entre sí.

[0117] La actividad de Rac1 se mantiene bajo control por la activación de ROCK inducida por RhoA (Sanz-Moreno et al., 2008). Según esto, la supresión de RhoA aumentó la migración (Figura 8g). Este efecto podría, sin embargo, ser completamente revertido mediante la cosupresión de TRAIL-R2 (Figura 8g). Dado que la migración mediada por KRAS oncogénicos, pero no WT, empleó TRAIL-R2 endógeno (Figura 1b), a continuación, probamos la capacidad de TRAIL de activar la Rac1 en células isogénicas con mutación de KRAS frente a células con KRAS WT. Descubrimos que el TRAIL sólo era capaz de hacerlo en células con mutación de KRAS (Figura 7e). Por lo tanto, la activación de Rac1 inducida por TRAIL se posibilita específicamente en las células cancerosas que expresan KRAS oncogénico. Esto explica por qué la migración iniciada por Rac1 no se reduce por la supresión de TRAIL-R2 en las células KRAS-WT.

[0118] A continuación, nos propusimos identificar qué vía de señalización en el extremo del gen KRAS oncogénico permitió a TRAIL/TRAIL-R2 activar Rac1. Como las células cancerosas con mutación de KRAS se vuelven resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL a través de la supresión de la vía de la ROCK/LIMK/cofilina (Hoogwater et al., 2010), pensamos que la supresión de ROCK mediada por KRAS oncogénico podría eliminar esta restricción de la activación de Rac1. De ser así, la inhibición farmacológica de ROCK en células KRAS-WT debería permitir a TRAIL/TRAIL-R2 activar Rac1 y, en consecuencia, la migración de estas células. De hecho, la fosforilación basal de la cofilina, en el extremo de ROCK/LIMK, se redujo en KRAS mutado en comparación con los homólogos isogénicos WT (Figura 8h). Del mismo modo, la atenuación génica transitoria de KRAS en células con mutación de KRAS aumentó la fosforilación de la cofilina (Figura 8i). De hecho, la inhibición de ROCK simuló la presencia de KRAS oncogénico en las células WT y permitió al TRAIL-R2 endógeno aumentar la migración; notablemente, todo el aumento por la inhibición de ROCK se evitó mediante la atenuación génica de TRAIL-R2 (Figura 7f). Sin embargo, la atenuación génica de KRAS no invirtió la migración inducida por la inhibición de ROCK en células KRAS WT (Figura 8j). Por lo tanto, el KRAS oncogénico actúa en el extremo superior y TRAIL/TRAIL-R2 en el extremo inferior en la inhibición de ROCK en la migración dependiente de Rac1. Por tanto, la inhibición de ROCK mediante otros medios que el KRAS mutado es suficiente para permitir a TRAIL-R2 señalizar la migración.

[0119] Mostramos aquí que la estimulación de TRAIL-R2/mTRAIL-R mediante TRAIL endógeno autocrino promueve la transformación mediada por KRAS, que los cánceres con mutación de KRAS emplean TRAIL/mTRAIL-R endógeno para acelerar la formación de PanIN y que la metástasis de PDAC depende de TRAIL/mTRAIL-R endógeno. Nuestros datos farmacodinámicos sugieren que la supresión de ROCK mediante KRAS oncogénico, que puede simularse mediante la inhibición farmacológica de ROCK, es un requisito previo para la activación de Rac1 mediante la estimulación autocrina de TRAIL-R2/mTRAIL-R para impulsar la migración de células cancerosas y, en consecuencia, la formación PanIN y la metástasis. Nuestro estudio proporciona nuevos conocimientos sobre la biología de la carcinogénesis iniciada por KRAS y, además, un nuevo razonamiento para desarmar terapéuticamente cánceres con mutación de KRAS, a saber, mediante la inhibición de (las actividades protumorigénicas de) TRAIL/TRAIL-R2.

RESUMEN DE LOS MÉTODOS

[0120] Atenuación génica mediada por ARNip. Los experimentos de atenuación génica se realizaron mediante la transfección transitoria de ARNip de control sin RISC, grupos de ARNip o secuencias individuales (Dharmacon) para silenciar las proteínas indicadas usando DharmaFECT I (Dharmacon) siguiendo el manual de instrucciones. Todas las líneas celulares se incubaron durante 48h para conseguir la atenuación génica suficiente.

[0121] Ensayos de migración. Los ensayos de migración se realizaron usando el sistema xCELLigence (Roche) según las instrucciones del fabricante. Véase la descripción detallada en la sección Métodos complementarios.

[0122] Modelos animales. Metástasis experimental: Se inyectaron ratones Fox Chase® SCID beige (Charles River, Alemania) de 12-semanas de edad con 2×10^6 células de control de vector A549-luc o shTRAIL-R2 a través de la vena lateral de la cola. Al empezar el día 1 después de la inyección de células, se tomaron imágenes de todos los ratones semanalmente para la bioluminiscencia usando el Ivis Spectrum (Caliper Life Science). Los fotones por segundo (flujo de fotones) se cuantificaron usando el software Ivis Spectrum. Se administraron vehículos o TRAIL-R2-Fc a 500 μ g por ratón i.p. según se indica (Figura 2g complementaria). Tumores subcutáneos: Se inyectaron ratones hembra Fox Chase® SCID beige (Charles River, Alemania) de 8 semanas de edad por vía subcutánea con $1,5 \times 10^6$ células de control de vector A549-luc o shTRAIL-R2 resuspendidas en 150 μ l de DPBS/Matrigel (50:50) (BD Bioscience) en ambos costados. Después de una semana, los tumores eran palpables y se midió su tamaño mediante un calibrador. Volumen del tumor = $0,52 \times \text{anchura} \times \text{longitud}^2$. Ratones KC/KPC-mTRAIL-R: Los ratones KRASG12D, p53R172H y PDX-1-Cre con antecedentes C57BL/6 fueron amablemente proporcionados por D. Tuveson, los ratones mTRAIL-Rfl/fl con antecedentes C57BL/6 se generaron previamente por nuestro laboratorio (Grosse-Wilde et al., 2008). La expresión de la recombinasa Cre iniciada por PDX-1 produce un patrón de mosaico de expresión de Cre (Hingorani et al., 2003) que elimina mTRAIL-R en las mismas células que se activan de forma concomitante para expresar KRAS^{G12D} (modelo KC) o KRAS^{G12D} y p53^{R172H}. Todos los ratones se mantuvieron bajo una licencia de proyecto apropiada del Reino Unido.

Material y Métodos

50 Reactivos

[0123] Anticuerpos: se adquirió α -FADD de BD Bioscience, α -KRAS de Santa Cruz, α - β -actina de Sigma, α -Rac1 y α -Rho de Millipore, α -TRAIL-R2, α -pCofilina, α -Cofilina, de Cell Signalling, α -caspasa-8 como se ha descrito (Scaffidi et al., 1997), α -TRAIL de Alexis y α -TRAIL-R1 de ProSci, α -mTRAIL-R fue producido en nuestro laboratorio. HS101, HS201, H301 y H402 se utilizaron para la tinción de la superficie de TRAIL-R1 a TRAIL-R4 y están disponibles en Alexis. Proteínas recombinantes: DR6-Fc, TRAIL-R2-Fc y TNF-R2-Fc se purificaron de los sobrenadantes de las células HEK293T transfectadas a través de columnas de proteína A (GE Healthcare), iz-TRAIL se produjo en E. coli,

se purificó como se ha descrito previamente (Ganten et al., 2006), iz-TRAIL estaba libre de LPS después de la purificación como se probó mediante un ensayo del lisado de amebocitos de Limulus (LAL) (LONZA). PD98059, NSC23766, Y27632 se adquirieron de Calbiochem y PIK75 se adquirió de Selleck Chemicals.

Líneas celulares

5 [0124] Los pares de líneas celulares isogénicas de cáncer colorrectal DLD-1/DKO4 y HCT116/Hkh-2 (Shirasawa et al., 1993) y DLD-1 dnFADD fueron amablemente proporcionados por O. Kranenburg, las líneas celulares de cáncer de páncreas Panc Tu I y Colo357 fueron amablemente proporcionadas por A. Trauzold, la línea celular DT8082 de KRAS^{G12D}/p53^{R172H} murino fue amablemente proporcionada por D. Tuveson, el panel de adenocarcinoma humano de pulmón de líneas celulares con KRAS mutado y WT (H460, H520, H522, H322) fue amablemente proporcionado por J. Downward, se adquirieron células A549-luc de Caliper Life Science y la línea celular DT02 de carcinoma de piel con HRAS mutado murino se generó previamente en nuestro laboratorio (Grosse-Wilde et al., 2008). Las células DLD-1, DKO4, HCT116, Hkh-2 y DLD-1 dnFADD se cultivaron en DMEM complementado con 10% de FCS y 2 mM de glutamina, las células DT8082 y DT02 se cultivaron en DMEM complementado con 10% de FCS, Panc Tu I y Colo357 se cultivaron en RPMI1640 complementado con 10% de FCS, 2 mM de glutamina y 1 mM de piruvato de sodio y el panel de línea celular de cáncer de pulmón humano incluyendo las células A549-luc se cultivaron en RPMI1640 complementado con 10% de FCS.

Ensayos de migración

20 [0125] Los ensayos de migración se realizaron usando el sistema xCELLigence (Roche) que utiliza placas de microtitulación especialmente diseñadas que contienen microelectrodos de oro para medir la impedancia de las células que se adhieren a los electrodos en tiempo real. El aumento de la impedancia de los pocillos de control de fondo se sustrajo de todos los demás valores, el aumento en la impedancia/migración de las células transfectadas con ARNip de control/infectadas por vectores de control se definió entonces como 100% de migración y, en consecuencia, se calculó la migración relativa de todas las otras muestras transfectadas como comparación entre células de control y transfectadas. Las placas de migración (CIM 16) se basan en el principio de cámara de Boyden, la superficie inferior del filtro se cubre con microelectrodos que miden células que han migrado a través de los poros y se adhieren a la superficie inferior del filtro en tiempo real. Brevemente, las cámaras inferiores de una placa CIM 16 se llenan con medios que contienen FCS al 2% como factor quimiotáctico, la parte superior se montó y se añadieron 30 µl de medio sin FCS a los pocillos superiores. A continuación, la placa se equilibró en la incubadora durante 1h. Las células se tripsinizaron y se lavaron tres veces en un medio sin FCS. Entonces, 8 x 10⁵ células se resuspendieron en 1 ml de medio sin FCS y se añadieron 100 µl de suspensión celular a cada pocillo después de haber realizado una medición de fondo sin células. Se incluyeron cuatro pocillos sin células (solamente medios sin FCS) como control de fondo del ensayo. Las células se dejaron reposar en la parte superior del pocillo de las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos y después las placas se devolvieron al sistema RTCA-DP xCELLigence y se tomaron mediciones de impedancia cada minuto. Las células que habían sido transfectadas con ARNip se dejaron migrar por un total de 6h y las células infectadas con ARNhp estables por un total de 12h.

Ensayos en agar blando

40 [0126] El crecimiento de células en agar blando se determinó usando el Cell Transformation Detection Assay (Millipore). Se usaron 500 µl de agar noble al 0,8% en H₂O/medio estéril 1:2 por cada uno de los 24 pocillos. El agar inferior se dejó reposar durante 20 minutos a 4 °C. Mientras tanto, las células se lavaron con DPBS, se tripsinizaron y se filtraron a través de filtros de 40 µm para obtener una solución de una única célula. Se mezclaron 10000 células por 24 pocillos con 250 µl de agar superior al 0,4% (agar inferior más diluido en el medio) e inmediatamente se coloca en la parte superior del agar inferior precalentado. Después de que el agar gel superior se hubiera fijado, se colocaron 250 µl de medio en la parte superior. Se dejó que las células formaran colonias durante 4 semanas, se tiñeron utilizando la solución de tinción celular proporcionada por el kit y se contaron todas las colonias.

45 Tinción de la superficie de TRAIL-R

50 [0127] Se separaron las células usando Accutase (Sigma) y se contaron. 2 x10⁵ células se incubaron con 10 µg/ml de anti-TRAIL-R1, -R2, -R3 y -R4 (HS101, HS201, HS301 y HS402) o anticuerpo IgG1 de control de isotipo en 2% de BSA en PBS (BSA/PBS) durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con BSA/PBS enfriado con hielo antes de la incubación con APC secundario de cabra antiratón (BioLegend) a una dilución de 1:200 en BSA/PBS durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron tres veces en BSA/PBS enfriado con hielo y la expresión de la superficie se evaluó mediante citometría de flujo.

Análisis Western Blot

[0128] Las células se trataron como se indica y después se lisaron en tampón IP-lisis (30 mM Tris-HCl [pH 7,4], NaCl 120 mM, EDTA 2 mM, KCl 2 mM, 1% de Triton X-100, 1 × COMPLETE cóctel inhibidor de la proteasa) a 4 °C durante 30 min. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE (NuPAGE) y se analizaron mediante pruebas de Western Blot. Las membranas se retiraron con glicina 50 mM (pH 2,3) antes de volver a investigar con otros anticuerpos.

[0129] Generación de células que expresan ARNhc dirigidas a TRAIL-R1 y TRAIL-R2. Se sembraron células A549-luc/DLD-1 a 500.000 células en matraces de 25 cm². Al día siguiente, se infectaron con un lentivirus sobrenadante en un medio diluido al 1:2, conteniendo secuencias ya sea para el vector (pKO.1) o para cinco secuencias de ARNhc diferentes para TRAIL-R1 humano o TRAIL-R2 humano, respectivamente. Todas las secuencias se compraron a Sigma. Después de la incubación de 48h con el virus, las células se sometieron a selección con 2 µg/ml de puomicina durante 2 semanas. Después, las células seleccionadas se sometieron a un análisis Western Blot para analizar los niveles de supresión de TRAIL-R. Para TRAIL-R1, la secuencia CCGGCTTAGGTGTTAGGAGTTAATACTCGAGTATTAACCTAACACCTAAGTTTT (Sigma Cat n.º TRCN000005934) (shTRAIL-R1) generó la atenuación génica suficiente en comparación con células infectadas por vectores y, por tanto, las células infectadas con esta secuencia se eligieron para análisis posteriores. Para TRAIL-R2, sólo la secuencia CCGGCGAGAAGATTGAGGACCACTTCTCGAGAAGTGGTCCTCAATCTTCTGCTTTTT (Sigma Cat n.º TRCN000005933) (shTRAIL-R2) generó la supresión suficiente de expresión de TAIL-R2 y, por tanto, las células infectadas con esta secuencia también se eligieron para análisis posteriores. La secuencia Sigma Cat n.º TRCN000005930 dirigida a TRAIL-R2 no produjo una atenuación génica significativa en células A549 y se utilizaron como ARNhc de control (shCtr, del inglés shControl).

Generación de líneas celulares que inactivan FADD

[0130] Se transfectaron células A549-luc con 5 µl de ARNm que codifican una nucleasa con dedos de zinc dirigida a FADD (CompoZr®, Sigma-Aldrich) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). La nucleasa con dedos de zinc genera roturas del ADN bicatenario que, en el extremo de la unión no homóloga, en algunos casos, hace que el gen interrumpa una inactivación. Posteriormente, se sembraron células individuales en una placa de 96 pocillos en un medio de crecimiento RPMI complementado con FCS al 10% y 30% de medio acondicionado. Después de dos semanas, se seleccionaron las colonias de células individuales y, posteriormente, se sembraron en una placa de 12 pocillos para una mayor expansión. Después de una semana más, se lisaron las células cultivadas a partir de un único clon de células y se seleccionaron mediante Western Blot para determinar la presencia o ausencia de FADD.

Ensayos de extracción de Rac1

[0131] Se sembraron 2,5 x 10⁶ células en placas de 10 cm. Al día siguiente, las células se incubaron con y sin 100 ng/ml de iz-TRAIL. La lisis celular y extracción de Rac1 se realizó usando un kit de extracción de Rac1 (Millipore) según las instrucciones del fabricante. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (NuPAGE) y se analizaron mediante prueba de Western Blot.

Análisis confocal

[0132] Las células se sembraron en cubreobjetos microscópicos recubiertos con polilisina a 2,5 x 10⁴ células/24 pocillos. Al día siguiente, las células se trataron como se indica, a continuación, se fijaron durante 10 minutos en 5% de formaldehído, se permeabilizaron posteriormente (en PBS que contenía 0,02% de Triton-X 100 y 1% de BSA durante 5 minutos) y se bloquearon (en 1% de BSA durante 1 hora). La faloidina de acoplamiento rojo texas (Invitrogen, Molecular Probes) se usó en 5 µl/200 µl en un tampón de bloqueo según lo sugerido por el fabricante y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS, y los cubreobjetos teñidos con faloidina se montaron en DAPI (ProLong® Golds antifade reactivo con DAPI, Invitrogen). Las imágenes se adquirieron a x400 aumentos utilizando un microscopio confocal y software (Leica).

Ensayo de proliferación de BrdU

[0133] 24h después de haber sometido las células a atenuaciones génicas transitorias como se describe en los procedimientos experimentales, se añadió stock de BrdU (kit de ensayo de proliferación celular de Calbiochem) a una dilución de 1:2000 en medio y se incubó durante otras 24h. A continuación, el ensayo de proliferación de BrdU se realizó según las instrucciones del fabricante.

Ensayo de luciferasa

[0134] Las células A549-luc de atenuación génica estable se sembraron en los números indicados en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, el medio se retiró y las células se permeabilizaron con 30 µl de tampón de permeabilización

(eBioscience) durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 30 µl de tampón que contenía luciferina de luciérnaga (tampón de ensayo de luciferasa) y se incubaron durante 10 minutos. La luminiscencia relativa se determinó utilizando un lector de placas de Mithras.

Inmunohistoquímica (IHC)/inmunofluorescencia (IF)

5 [0135] Para la preparación de secciones de tejido de pulmón, los ratones se sacrificaron 3,5 semanas después de la
inyección de células según la guía orientativa *Guidance on Operation of Animals [Scientific Procedures] Act 1986*.
De cada ratón se retiró el lóbulo superior del pulmón izquierdo, se fijó en formalina (Sigma) al 10% durante una
semana y después se transfirió a etanol al 70%. La adhesión en parafina, la preparación de las secciones y las
10 tinciones con hematoxilina y eosina se realizaron como parte de un servicio de tinción histológica del National Heart
& Lung Institute. Las secciones de parafina se tiñeron para Ki67 (Dako) a una dilución 1/80 y CK19 (AHP1846,
Serotec) a 5 µg/ml. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron pasando los portaobjetos a través de xileno y
grados descendentes de alcohol y, a continuación, enjuagándolos con agua. Los portaobjetos se incubaron durante
15 minutos con solución de peróxido de hidrógeno al 0,6% para IHC. Los portaobjetos se enjuagaron y se
sumergieron en tampón de citrato 0,1 M (pH 6,0) y se calentaron durante 15 minutos (750 vatios) para la extracción
del antígeno. A continuación, las láminas se enfriaron inmediatamente con agua corriente y se enjuagaron en
solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadieron 100 µl de bloque de proteína a cada portaobjetos
durante 5 minutos. Después de enjuagarlos con solución de PBS/Tween 20 al 0,05% durante 5 minutos, los
portaobjetos se incubaron con 100 µl del anticuerpo primario a 4 °C durante la noche. Después de la incubación
durante la noche, los portaobjetos se lavaron con solución de PBS/Tween 20 al 0,05%. A continuación, las
20 secciones se incubaron con el anticuerpo secundario durante 30 minutos (IHC) o 1 h (IF) a temperatura ambiente y
se volvieron a lavar tres veces. Las secciones se desarrollaron usando el kit ABC (Vector Laboratories) antes de
contrateñirse con hematoxilina durante 2 minutos y enjuagarse en agua durante 5 minutos para IHC. A continuación,
los portaobjetos se deshidrataron a grados ascendentes de alcohol y se aclararon en 3 cambios de xileno (IHC). Por
último, las secciones se montaron utilizando solución de montaje ftalato de di-n-butilo en xileno (DPX) y se cubrieron
25 con un cubreobjetos de vidrio (IHC) o montado en DAPI (reactivo antidesdoblamiento ProLong® Golds con DAPI,
Invitrogen) (IF). Para los controles negativos, se utilizaron portaobjetos duplicados de cada caso. Estos portaobjetos
se incubaron con 100 µl de diluyente de anticuerpos en lugar de anticuerpo primario/anticuerpo secundario. Las
tinciones con hematoxilina y eosina fueron examinadas por una patóloga experimentada (Mona A. El-Bahrawy) que
desconocía el estudio. El ensayo TUNEL se realizó utilizando el TACS•XL®-Blue Label in Situ Apoptosis Detection
30 Kit según las instrucciones del fabricante (Trevigen). La carga tumoral se cuantificó como porcentaje de tejido
tumoral en el pulmón, las células positivas en Ki67 y TUNEL como el porcentaje de células dentro de los nódulos
tumoriales.

Zootecnia

35 [0136] Todos los ratones se mantuvieron en jaulas ventiladas individualmente (IVC), los ratones SCID beige
recibieron alimentos esterilizados en autoclave, agua y lecho según directrices institucionales bajo una licencia de
proyecto del Ministerio del Interior del Reino Unido. Se obtuvieron las evaluaciones de riesgo requeridas para este
estudio.

| | | |
|-------------|-------------------|--|
| KRAS-WT | Origen del cáncer | TRAIL-R2 KD [% de reducción de la migración] |
| DKO4 | Colorrectal | -0,3 |
| Hkh-2 | Colorrectal | 18,1 |
| H520 | Pulmón | 14,5 |
| H522 | Pulmón | 27,3 |
| H322 | Pulmón | 50,0 |
| KRAS mutado | origen del cáncer | TRAIL-R2 KD [% de reducción de la migración] |
| DLD-1 | Colorrectal | 49,0 |
| A549 | Pulmón | 51,3 |
| H460 | Pulmón | 41,9 |
| Panc Tu 1 | Pancreático | 53,4 |
| Colo357 | Pancreático | 82,4 |
| DT8082* | Pancreático | 97,0 |

Tabla complementaria 1| Reducción de la migración mediada por la atenuación génica de TRAIL-R2 en un panel comparativo de líneas celulares de KRAS mutado y WT. KD = atenuación génica transitoria; WT = de tipo salvaje; *murino

Ejemplo 2: Construcción de la proteína de fusión

5 [0137] Se construyó una proteína de fusión que consistía en la mayoría del dominio extracelular de TRAIL-R2 humano fusionado a la porción Fc de la IgG1 humana, conteniendo una porción del dominio de bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 de la IgG1 humana.

[0138] La secuencia del dominio Fc de la IgG1 humana es de: Ellison, J., "The nucleotide sequence of human immunoglobulin C gene", Nucleic Acid Research, Volumen 10 Número 13, 1982. El ADNc fue creado a partir de ARN total aislado de linfocitos de sangre periférica (PBL, por sus siglas en inglés) de sangre de donantes mediante RT-PCR usando el cebador Oligo dT. Se utilizó una PCR para amplificar el ADNc de Fc de IgG1 humana (bisagra parcial más CH2 más CH3) con una secuencia de superposición para TRAIL-R2 en el cebador sentido (subrayado y en negrita en la secuencia del cebador sentido) y un sitio EcoRI (subrayado en la siguiente secuencia del cebador antisentido) que sigue al codón de terminación (en negrita en la siguiente secuencia del cebador antisentido) en el cebador antisentido.

Cebador: hulG1 sentido: cca ggg act cct gcc **TCT** TGT GAC AAA ACT CAC ACA TG (letras mayúsculas=> parte de hulG1) IF.

Cebador: EcoR1-hulG1 antisentido: TATA gaa ttc tca ttt acc cgg aga cag gg

20 [0139] La secuencia de TRAIL-R2 humano es de Walczak et al. 1997, "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL" The EMBO Journal Vol. 16, No. 17, pp. 5386-5397, 1997 (Número de acceso DDBJ/EMBL/GenBank: AF016849).

Como se indica en el ejemplo 3 y 4, el ADNc se creó a partir del ARN total aislado de linfocitos de sangre periférica (PBL) de sangre de donantes mediante RT-PCR usando un cebador Oligo dT. Se utilizó una PCR para amplificar una parte del ADNc de TRAIL-R2 incluyendo un sitio de restricción Hind III y una secuencia Kozak en el extremo 5' (subrayado en la secuencia del cebador sentido a continuación) del cebador sentido anterior al codón de inicio (escrito en negrita en la secuencia del cebador sentido a continuación) y en el cebador antisentido una secuencia de superposición a la IgG1 humana (un codón que codifica el aminoácido 207 (serina); escrito en negrita y subrayado en la secuencia del cebador antisentido a continuación).

Cebador: HindIII-huTRAIL-R2 sentido: TATA aag ctt gcc acc **atg** gaa caa egg gga cag aac

30 Cebador: huTRAIL-R2 antisentido: gtg agt ttt gtc aca aga GGC AGG AGT CCC TGG (letras mayúsculas=> parte huTRAIL-R2, a la inversa)

[0140] Procedimiento de clonación: Después de la amplificación, se realizó una extracción en gel para aislar los insertos modificados. A continuación, se realizó una tercera PCR utilizando ambos fragmentos. Debido a la superposición de ambos fragmentos y los cebadores al final, esta PCR une en un solo producto. Después, el producto se digirió con Hind III y EcoR I y se ligó en un vector de expresión adecuado, en este caso pcDNA3.1 (Invitrogen).

Cebador: HindIII-huTRAIL-R2 sentido: TATA aag ctt gcc acc atg gaa caa cgg gga cag aac

Cebador: EcoRI-hulG1 antisentido: TATA gaa ttc tca ttt acc cgg aga cag gg

Expresión de la proteína de fusión TRAIL-R2-Fc:

40 [0141] Las células HEK293T se transfectaron mediante el método de transfección CaCl₂ con el vector de expresión basado en pcDNA3.1 anteriormente indicado para TRAIL-R2-Fc (pcDNA3.1-TRAIL-R2-Fc). Los sobrenadantes de cultivos celulares que contenían proteínas recombinantes se recolectaron después de 48h, 72h y 96h. Estas fracciones se agruparon, filtraron (0,2 µm) y purificaron por afinidad a través de columnas de proteína A (GE Healthcare).

45 Ejemplo 3: Secuencia de aminoácidos de TRAIL-R2

[0142] El dominio extracelular de TRAIL-R2 maduro (es decir, sin la secuencia líder) se muestra en negrita. La parte del dominio extracelular contenida en la proteína TRAIL-R2-Fc madura está subrayada. La diferencia entre TRAIL-R2 maduro e inmaduro es el péptido líder para TRAIL-R2 humano, según Walczak et al.

ES 2 791 624 T3

([http://www.uniprot.org/blast/?about=O14763\[56-210\]](http://www.uniprot.org/blast/?about=O14763[56-210])). La posición exacta del N-terminal puede variar en unos pocos aminoácidos lo que significa que la proteína madura puede ser, p. ej., de tres a cinco aminoácidos más corta o más larga.

```

      10      20      30      40      50      60
MEQRGQNPAA ASGARKRHGP GPREARGARP GPRVPKTLVL VVAAVLLLVS AESALITQOD
-----
      70      80      90     100     110     120
LAPQORAAPQ QKRSSPSEGL CPPGHHISED GRDCISCKYG QDYSTHWNDL LFCLRCTRCD
-----
     130     140     150     160     170     180
SGEVELSPCT TTRNTVCQCE EGTFREEDSP EMCRCRTGC PRGMVKVGC TPWSDIECVH
-----
     190     200     210     220     230     240
KESGTKHSGE VPAVEETVTS SPGTPASPCS LSGIIIGVTV AAVVLIVAVF VCKSLLWKKV
-----
     250     260     270     280     290     300
LPYLKGICSG GGGDPERVDR SSQRPGAEDN VLNEIVSILQ PTQVPEQEME VQEPAEPTGV
-----
     310     320     330     340     350     360
NMLSPGESEH LLEPAEAERS QRRRLVLPAN EGDPTETLRQ CFDDFADLVP FDSWEPLMRK
-----
     370     380     390     400     410     420
LGLMDNEIKV AKAEAAGHRD TLYTMLIKWV NKTGRDASVH TLLDALETLG ERLAKQKIED
-----
     430     440
HLLSSGKFMY LEGNADSAMS

```

5 Ejemplo 4: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos (de Walczak et al. 1997)

[0143]

```

1  GAATTCGGCCGACCCGCTCATAAATCAGCACGGCCGGAGAACCCCGCAATCTTTGCGCCACAAAATACCCGACGATGCCCGATCTACTTTAAGGGCTGAAACCCACGGCCCTGAGAG 120
121 ACTATAAGAGCGTTCCTACCGCCATGGAAACAACGGGACAGAAACCGCCCGCCGCTTCGGGGGCCCCGAAAAGGCACGGCCAGGACCCAGGGAGGCGGGGGAGCCAGGCTGGGCC 240
1  MEQRGNAPAAASGARKRKHGPGPREARGARFGP 32
241  CGGGTCCCCAAGACCTTGTGCTCGTGTGTCGGCCGGTCTGCTGTGGTCTCAGCTGAGTCTGCTGATCACCACCAAGACCTAGCTCCCGAGCAGAGACGGCCCAACAAAAG 360
33  RVFRFLVLLVVA AVL L L V S A E S A L I T Q Q D L A P Q Q R A A F Q Q K 72
361  AGGTCCAGCCCTCAGAGGGATGTGTCCACCTGGACACCATATCTCAGAAGACGGTAGAGATTGCATCTCCTGCAAAATATGGACAGGACTATAGCACTCACTGGAAATGACCTCTTTTC 480
73  RSSPSEGLCPFGHHISEEDGRDCISCK YGQDYSTHWNDDLFL 112
481  TCGTTGCGCTGCACCAGTGTGATTTCAGGTGAAGTGGAGCTAAGTCCGTGCACCACGACCAACACAGTGTGTCAAGTGGCAAGAGCCACTTCCGGGAGAAGATTCTCTGAGATG 600
113  CLR CTR CDSGEVELSPECTTTR NTV C Q C E E G T F R E E D S P E M 152
601  TCCCGGAAGTCCGCACAGGGTTCACAGAGGGATGGTCAAGTCCGATGTTACACCTGGAGTGACATCGAATGTGCCACAAAGATCAGGTACAAGCACAGTGGGGAAGCCCA 720
153  CR KCR TGC PRGMVK VGDCTFPWSDIECVHK ESGTKHSGEAP 192
721  GCTGTGGAGGACCGGTGACCTCCAGCCACGGACTCTGCCTCTCCCTGTTCTCTCTCAGGCATCATATAGGAGTACAGTTGCAGCCGTAGTCTTGATTTGGCTGTGTTTGTTC 840
193  AVEETVTS SFGTFAS P C S L S G I I I G V T V A A V V L I V A V F V C 232
841  AAGCTTTACTGTGGAAGAAAGTCTTCCTTACCTGAAAGGCATCTGCTCAGGTGGTGGTGGGGACCTGAGCGTGTGGACAGAAGCTCACACGACCTGGGCTGAGGACAATGTCTC 960
233  KSL L L W K K V L P Y L K G I C S G G G G D P E R V D R S S Q R P G A E D N V L 272
961  AATGAGATCGTGTGATATCTTCAGCCACCCAGTCCCTGAGCAGSAAATGGAAGTCCAGGACCCAGCAGAGCCACAGTGTCAACATTTGTCCCGGGAGTCAAGCATCTGCTG 108
273  NEIVSILQPTQVP EQEMEVQEP A E P T G V N M L S P G E S E H L L 312
1081  GAACCCGAGAACTGAAAGTCTCAGAGGAGGAGGCTGCTGGTTCAGCAATGAAAGTGGATCCCACTGAGACTCTGAGACAGTGCCTTCGATGACTTTGAGACTTTGGTCCCTTTGAC 120
313  EPAEAERSQRRL L L V P A N E G D P T E T L R Q C F D D F A D L V P F D 352
1201  TCCGGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTGGCCCTCATGGACAATGAGATAAAGTGGCTAAAGCTGAGGACGGGCCACAGGGACACCTTGTACAGATGCTGATAAAGTGGGTCAACAAA 132
353  S W E F L M R K L G L M D N E I K V A K A E A A G H R D T L Y T M L F K W V N K 392
1321  ACCGGCCGAGATGCCCTCCTGCCACCCCTGCTGATGCTGAGACGCTGGGAGAGAGACTTGCCAAGCAGAAGATTGAGGACCATTGTTGAGCTCTGAAAAGTTCATGTATCTAGAA 144
393  TGR D A S V H F L L D A L E T L G E R L A K Q K I E D H L L S S G K F M Y L E 432
1441  GGTAAATGACACTGCGCATGCTCTAAGTGTGATTCTCTTCAGGAAGTGAGACCTTCCTGGTTCACCTTTTCTGGAAAAGCCCACTGGACTCCAGTCAGTGAAGTGGCCACAA 156
433  G N A D S A M S * 441
1561  TTGTACATGACCGGTACTGGAAGAACTCTCCATCCAACATCACCCAGTGGATGGAACATCCTGTAACTTTTCACTGCACTTGGCATTATTTTATAAGCTGAATGTGATAATAAGGA 168
1681  CACTATGAAAATGTCTGGATCATTCGGTTTGTGCGTACTTTGAGATTGGTTGGGATGTCATGTTTTTCACAGCACTTTTTATCCTAATGTAATGCTTTATTTATTTGGGCTA 180
1801  CATTGTAAGATCCAGCAGGTCTGCTCGTTTCAAGATCTGTTAAACTAGTTAGCTAGGC 1859

```

Ejemplo 5: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos para TRAIL:

[0144] Nucleótidos: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CR456895.1>)

```

1  atggctatga tggagggtcca ggggggaccc agcctgggac agacctgcgt gctgatcggt
61  atcttcacag tgcctcctgca gtctctctgt gggcctgtaa cttacgtgta ctttaccac
121  gagctgaagc agatgcagga caagtactcc aaaagtggca ttgcttgttt cttaaaagaa
181  gatgacagtt attgggaccc caatgacgaa gagagtatga acagccccctg ctggcaagtc
241  aagtggcaac tccgtcagct cgttagaaaag atgattttga gaacctctga ggaaccatt
301  tctacagttc aagaaaagca acaaaatatt tctccctag tgagagaaag aggtcctcag
361  agagtgcag ctcacataac tgggaccaga ggaagaagca acacattgct tctccaaac
421  tccaagaatg aaaaggctcc gggccgcaaa ataaactcct gggaatcac aaggagtggg
481  cttcattcc tgagcaact gcacttgagg aatgg-gaac tggtcacca tgaaaaaggg
541  tttactaca totattcca aacatactt cgatttcag aggaaataaa agaaaaacac
601  aagaacgaca aacaaatggt ccaatatatt tacaataca caagtatcc tgaccotata
661  ttgttgatga aaagtgcag aatagttgt tggctaaag atgcagaata tggactctat
721  tccatctatc aagggggaat atttgagctt aaggaaaatg acagaatttt tgtttctgta
781  acaaatgagc acttgataga catggaccat gaagccagtt ttttggggc ctttttagtt
841  ggttaa

```

5

[0145] Aminoácidos: (<http://www.uniprot.org/uniprot/P50591>)

ES 2 791 624 T3

```

      10           20           30           40           50           60
MAMMEVQGCP SLGQTCVLIV IFTVLLQSLC VAVTYVYFTN ELKQMQDKYS KSGIACFLKE

      70           80           90          100          110          120
DDSYWDPNDE ESMNSPCWQV KWQLRQLVRK MILRTSEETI STVQEKQQNI SPLVRERGPQ

     130          140          150          160          170          180
RVAAHITGTR GRSNTLSSPN SKNEKALGRK INSWESSRSG HSFLSNLHLR NGELVIHEKG

     190          200          210          220          230          240
FYYIYSQTYF RFQEEIKENT KNDKQMVQYI YKYTSYDPPI LLMKSARNSC WSKDAEYCLY

     250          260          270          280
SIYQGGIFEL KENDRIFVSV TNEHLIDMDH EASFFGAFLV G
  
```

Ejemplo 6: Secuencia de aminoácidos de la proteína TRAIL-R2-Fc

5 [0146] La parte de TRAIL-R2 está subrayada. La parte Fc está representada en negrita. Obsérvese que hay un solapamiento de un aminoácido entre la parte de TRAIL-R2 y la parte Fc de IgG1 humana. El péptido líder está representado en cursiva. La proteína madura comienza con la secuencia ITQQDLA (según Walczak et al., EMBO Journal 1997). Cuando se produce de forma recombinante, la posición exacta del N-terminal puede variar en unos pocos aminoácidos; que significa que la proteína madura puede ser, p. ej., de tres a cinco aminoácidos más corta o

```

MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGARPGPRVPKTLVLVVAAVLLLVS AESALITQQDLAPQQR
AAPQQKRSSPSEGLCPGHHISEDGRDCISCKYQDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSCEVELSPCTTT
RNTVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCRITGCPRGMVKVCDCPTWSDIECVHKESG TKHSCEVPAVEETV
TSSPGTIPASCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKARGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYS
KLTVDKSRWQOGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
  
```

más larga.

Ejemplo 7: Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína TRAIL-R2-Fc inmadura

[0147]

atggaacaacggggacagaaacgccccggccgcttcgggggcccggaaaaggcacggcccaggacc
agggagggcgggggagccaggcctggggccccgggtccccaaagacccttgtgctcgttgtcgccg
gtcctgctgttgggtctcagctgagctctgctctgatcaccacaagacctagctccccagcagaga
gccccccccacaaaagaggtccagccccctcagagggattgtgtccacctggacaccatctca
gaagacggtagagattgcatctcctgcaaatatggacaggactatagcaactcactggaatgacctc
cttttctgcttgcgctgcaccaggtgtgattcaggtgaagtggagctaaagtcctgcaccacgacc
agaaacacagtgctcagtcggaagaaggcaccttccgggaagaagattctcctgagatgtccgg
aaagtcccgcacagggtgtcccagagggatggtcaaggctcgggtgattgtacaccctggagtgcac
gaatgtgtccacaagaatcaggtacaaagcacagtggggaagtcccagctgtggaggagacgggtg
acctccagcccagggaactcctgccc**tctt**gtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacct
gaactcctgggggaccgtcagctcttcctctcccccaaaacc**caaggacaccctcatgatctcc**
cggaccctgaggtcacatgcgtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaac
tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagcccgggaggagcagtaaacagc
acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag
tgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaaggcag
ccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgctggtcaaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcag
cgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagc
aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

Literatura

5 [0148] Ahmad, E.I., Gawish, H.H., Al-Azizi, N.M., and El-Hefni, A.M. (2009). The Prognostic Impact of K-RAS Mutations in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients Treated with High Dose Cytarabine. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 21, 343-350.

Ahn, J., Sanz-Moreno, V., y Marshall, C.J. (2010). The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin beta3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J Cell Sci* 125, 1814-1826.

10 Amado, RG, Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, DJ., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., et al. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*: official journal of the American Society of Clinical Oncology 26, 1626-1634.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., et al. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104, 155-162.

Aziji, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G.J., de Jong, S., and Kruyt, F.A. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell death and differentiation* 20, 858-868.

20 Belin de Chantemele, E.J., Retailleau, K., Pinaud, F., Vessieres, E., Bocquet, A., Guihot, A.L., Lemaire, B., Domenga, V., Baufreton, C., Loufrani, L., et al. (2008). Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 2216-2224.

Bild, A.H., Yao, G., Chang, J.T., Wang, Q., Potti, A., Chasse, D., Joshi, M.B., Harpole, D., Lancaster, J.M., Berchuck, A., et al. (2006). Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 439, 353-357.

25 Boix-Ferrero, J., Pellin, A., Blesa, J.R., Adrados, M., and Llombart-Bosch, A. (2000). K-ras Gene Mutations in Liver Carcinomas from a Mediterranean Area of Spain. *International journal of surgical pathology* 8, 267-270.

Chaffer, C.L. and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331, 1559-1564.

Daniels, R.A., Turley, H., Kimberley, F.C., Liu, X.S., Mongkolsapaya, J., Ch'En, P., Xu, X.N., Jin, B.Q., Pezzella, F., and Screaton, G.R. (2005). Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Res* 15, 430-438.

30 Deschoolmeester, V., Boeckx, C., Baay, M., Weyler, J., Wuyts, W., Van Marck, E., Peeters, M., Lardon, F., and Vermorken, J.B. (2010). KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *British journal of cancer* 103, 1627-1636.

Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.

35 Ehrenreiter, K., Kern, F., Velamoor, V., Meissl, K., Galabova-Kovacs, G., Sibilia, M., and Baccarini, M. (2009). Raf-1 addiction in Ras-induced skin carcinogenesis. *Cancer cell* 16, 149-160.

Ganten, T.M., Koschny, R., Sykora, J., Schulze-Bergkamen, H., Buchler, P., Haas, T.L., Schader, M.B., Untergasser, A., Stremmel, W., and Walczak, H. (2006). Preclinical differentiation between apparently safe and potentially

- hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 2640-2646.
- 5 Ganten, T.M., Sykora, J., Koschny, R., Batke, E., Aulmann, S., Mansmann, U., Stremmel, W., Sinn, H.P., and Walczak, H. (2009). Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J Mol Med (Berl)* 87, 995-1007.
- Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J., and Zheng, Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7618-7623.
- 10 Gonzalez de Castro, D., Angulo, B., Gomez, B., Mair, D., Martinez, R., Suarez-Gauthier, A., Shieh, F., Velez, M., Brophy, V.H., Lawrence, H.J., et al. (2012). A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *British journal of cancer* 107, 345-351.
- Grady, W.M., and Markowitz, S.D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3, 101-128.
- 15 Grosse-Wilde, A., Voloshanenko, O., Bailey, S.L., Longton, G.M., Schaefer, U., Csernok, A.I., Schutz, G., Greiner, E.F., Kemp, C.J., and Walczak, H. (2008). TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *J Clin Invest* 118, 100-110.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Heid, I., Lubeseder-Martellato, C., Sipos, B., Mazur, P.K., Lesina, M., Schmid, R.M., and Siveke, J.T. (2011). Early requirement of Rac1 in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 141, 719-730, 730 e711-717.
- 20 Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 362, 1605-1617.
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell* 4, 437-450.
- 25 Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., and Tuveson, D.A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell* 7, 469-483.
- Hoogwater, F.J., Nijkamp, M.W., Smakman, N., Steller, E.J., Emmink, B.L., Westendorp, B.F., Raats, D.A., Sprick, M.R., Schaefer, U., Van Houdt, W.J., et al. (2010). Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 138, 2357-2367.
- 30 Ito, K., Watanabe, K., Nasim, S., Sasano, H., Sato, S., Yajima, A., Silverberg, S.G., and Garrett, C.T. (1996). K-ras point mutations in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient. *Gynecologic Oncology* 63, 238-246.
- Jaffee, E.M., Hruban, R.H., Canto, M., and Kern, S.E. (2002). Focus on pancreas cancer. *Cancer cell* 2, 25-28.
- 35 Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S., et al. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 359, 1757-1765.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 517-531.
- 40 Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611-620.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of biological chemistry* 276, 46639-46646.
- 45 Klein, R.M., Spofford, L.S., Abel, E.V., Ortiz, A., and Aplin, A.E. (2008). B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol Biol Cell* 19, 498-508.
- Macher-Goeppinger, S., Aulmann, S., Tagscherer, K.E., Wagener, N., Haferkamp, A., Penzel, R., Brauckhoff, A., Hohenfellner, M., Sykora, J., Walczak, H., et al. (2009). Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 650-659.
- 50 Mitsuuchi, Y., and Testa, J.R. (2002). Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet* 115, 183-188.
- Newsom-Davis, T., Prieske, S., and Walczak, H. (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 14, 607-623.
- 55 Ozawa, F., Friess, H., Kleeff, J., Xu, Z.W., Zimmermann, A., Sheikh, M.S., and Buchler, M.W. (2001). Effects and expression of TRAIL and its apoptosis-promoting receptors in human pancreatic cancer. *Cancer letters* 163, 71-81.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V.M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.
- 60 Phipps, A.I., Buchanan, D.D., Makar, K.W., Win, A.K., Baron, J.A., Lindor, N.M., Potter, J.D., and Newcomb, P.A. (2013). KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. *British journal of cancer* 108, 1757-1764.
- Przybojewska, B., Jagiello, A., and Jalmuzna, P. (2000). H-RAS, K-RAS, and N-RAS gene activation in human bladder cancers. *Cancer genetics and cytogenetics* 121, 73-77.
- Sanlioglu, A.D., Koksai, I.T., Ciftcioglu, A., Baykara, M., Luleci, G., and Sanlioglu, S. (2007). Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues. *The Journal of urology* 177, 359-364.
- 65 Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510-523.

- Scaffidi, C., Medema, J.P., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *The Journal of biological chemistry* 272, 26953-26958.
- Screaton, G.R., Mongkolsapaya, J., Xu, X.N., Cowper, A.E., McMichael, A.J., and Bell, J.I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Current biology : CB* 7, 693-696.
- 5 Shirasawa, S., Furuse, M., Yokoyama, N., and Sasazuki, T. (1993). Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* 260, 85-88.
- Spierings, D.C., de Vries, E.G., Timens, W., Groen, H.J., Boezen, H.M., and de Jong, S. (2003). Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 3397-3405.
- 10 Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A., and Walczak, H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *The EMBO journal* 21, 4520-4530.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Joo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by
- 15 TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599-609.
- Todaro, M., Lombardo, Y., Francipane, M.G., Alea, M.P., Cammareri, P., Iovino, F., Di Stefano, A.B., Di Bernardo, C., Agrusa, A., Condorelli, G., et al. (2008). Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell death and differentiation* 15, 762-772.
- 20 van Krieken, J.H., Jung, A., Kirchner, T., Carneiro, F., Seruca, R., Bosman, F.T., Quirke, P., Flejou, J.F., Plato Hansen, T., de Hertogh, G., et al. (2008). KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 453, 417-431.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., and Ashkenazi, A. (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of biological chemistry* 280, 40599-40608.
- 25 Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., et al. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO journal* 16, 5386-5397.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5, 157-163.
- 30 Walsh, A.B., and Bar-Sagi, D. (2001). Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *The Journal of biological chemistry* 276, 15609-15615.
- Wegman, P., Ahlin, C., and Sorbe, B. (2011). Genetic alterations in the K-Ras gene influence the prognosis in patients with cervical cancer treated by radiotherapy. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society* 21, 86-91.
- Wu, G.S., Burns, T.F., Zhan, Y., Alnemri, E.S., and El-Deiry, W.S. (1999). Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer research* 59, 2770-2775.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Agente para su uso en un método para tratar el cáncer en un individuo con un cáncer con mutación de KRAS, comprendiendo el método la administración al individuo de la cantidad terapéuticamente efectiva del agente, donde el agente es un compuesto que previene o inhibe a TRAIL de unirse a TRAIL-R2, o interrumpe un complejo TRAIL/TRAIL-R2 resultante de dicha unión, en donde el agente es un compuesto seleccionado de la lista que consiste en:
- 5 (i) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a TRAIL-R2, neutralizando su actividad
 (ii) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TRAIL y lo neutraliza;
 10 (iii) una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de un TRAIL-R2, o una parte del mismo, fusionada a un dominio Fc de anticuerpos humanos, o una parte del mismo, con o sin la región bisagra del anticuerpo, o una parte de la misma, que se une a TRAIL y lo neutraliza.
2. Agente para su uso según la reivindicación 1(i), en donde:
 15 el anticuerpo ha sido generado contra un polipéptido TRAIL-R2; y/o
 el anticuerpo es monoclonal y/o es una γ -inmunoglobulina (IgG) y/o es un anticuerpo humanizado; o
 el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo scFv.
3. Agente para su uso según la reivindicación 1(ii), en donde:
 el anticuerpo ha sido generado contra un polipéptido TRAIL; y/o
 20 el anticuerpo es monoclonal y/o es una γ -inmunoglobulina (IgG) y/o es un anticuerpo humanizado; o
 el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo scFv.
4. Agente para su uso según la reivindicación 3, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos:
- Meqrgqnapaasgarkrhgpgpreargarpgprvptklvlvvaavllvsaesalitqddlapqqaapqqkrsspsegllcp
 pghhisedgrdciscskygqdysthwndllfclrctrcdsgevelspcttrntvcqceegtffreedspemcrkcrtgcprgmvk
 vgdctpwsdiecvhkesgkhsgevpaveetvtsspgtpascdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtc
 vvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvitvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgq
 prepqvytlppsrdeltknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgfflyskltvdksrwqqgnvfscs
 vmhealthnhytqkslslspgk,
- opcionalmente careciendo de 3 a 5 aminoácidos en el extremo N-terminal.
5. Agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho método inhibe o previene la activación de Rac1 por TRAIL y/o un TRAIL-R en el cáncer.
6. Método para cribar un agente que module o afecte una actividad biológica de TRAIL y/o TRAIL-R2 y, por lo tanto, disminuya la capacidad de TRAIL/TRAIL-R2 de activar Rac1, en donde dicha actividad biológica modulada o afectada se refiere a la inhibición de la activación de Rac1, comprendiendo el método las etapas de:
- 30 (a) incubar una mezcla que comprenda (i) TRAIL y/o TRAIL-R2, o fragmentos funcionales de los mismos, y
 (ii) un agente candidato, en condiciones en las cuales TRAIL y/o TRAIL-R2, o los fragmentos funcionales de los mismos, tengan actividad de referencia;
 (b) detectar la actividad de TRAIL o TRAIL-R2 o fragmentos funcionales de los mismos para determinar una actividad en presencia del agente;
 35 (c) determinar una diferencia entre la actividad en presencia del agente y la actividad de referencia, que opcionalmente comprende además la etapa de
 (d) producir el agente; y, además, combinar opcionalmente el agente producido con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado.
7. Agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el método la etapa de
 40 (i) seleccionar el individuo identificando la presencia de al menos una mutación en el gen KRAS en una muestra del individuo.
8. Método para determinar la probabilidad de eficacia de un método de tratamiento mediante un agente como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un paciente diagnosticado de cáncer, comprendiendo dicho método someter una muestra de ácido nucleico del cáncer del paciente a las pruebas de mutación KRAS mediante PCR, en donde la presencia de al menos una mutación en el gen KRAS indica una mayor probabilidad de eficacia farmacológica del tratamiento.
- 45

9. Agente para su uso según la reivindicación 7, o el método de la reivindicación 8, en donde la mutación en el gen KRAS se selecciona de Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gly12Cys, Gly12Ser, Gly12Ala y Gly12Arg, o se selecciona de 12D, 12V, 12C, 12A, 12S, 12R, 12F, 13D, 13C, 13R, 13S, 13A, 13V, 13I, 61H, 61L, 61R, 61K, 61E y 61P.
- 5 10. Agente para su uso según las reivindicaciones 1-5, 7 o 9, o el método de las reivindicaciones 8 o 9, en donde dicho cáncer se selecciona de los cánceres humanos siguientes: cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer cervicouterino, cáncer de hígado, leucemia mieloide, colangiocarcinoma y cáncer de vejiga.
11. Agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el agente es parte de una politerapia con un segundo agente terapéutico.
- 10 12. Agente para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un individuo con un cáncer con mutación de KRAS, en donde el agente reduce la actividad biológica de un receptor de TRAIL que es TRAIL-R2 y en donde dicha disminución en la actividad biológica causa una reducción o anulación de la activación de Rac1 mediante TRAIL-R2, y en donde el agente reduce la actividad biológica del receptor disminuyendo la expresión del receptor, y en donde el agente es un nucleótido de cadena simple o doble seleccionado de la lista que consiste en: ADN, ARN, APN, y 15 una molécula híbrida de ADN-ARN, que interfiere con la expresión de TRAIL-R2.
13. Agente para su uso según se reivindica en la reivindicación 12, en donde el ARN se selecciona de ARNip, miARN, o ARNhp.
14. Agente para uso según se reivindica en la reivindicación 12, en donde el nucleótido es una molécula de ADN o 20 ARN no codificante que se une a transcritos endógenos de TRAIL-R2 para reducir la expresión de receptor.

Figura 1

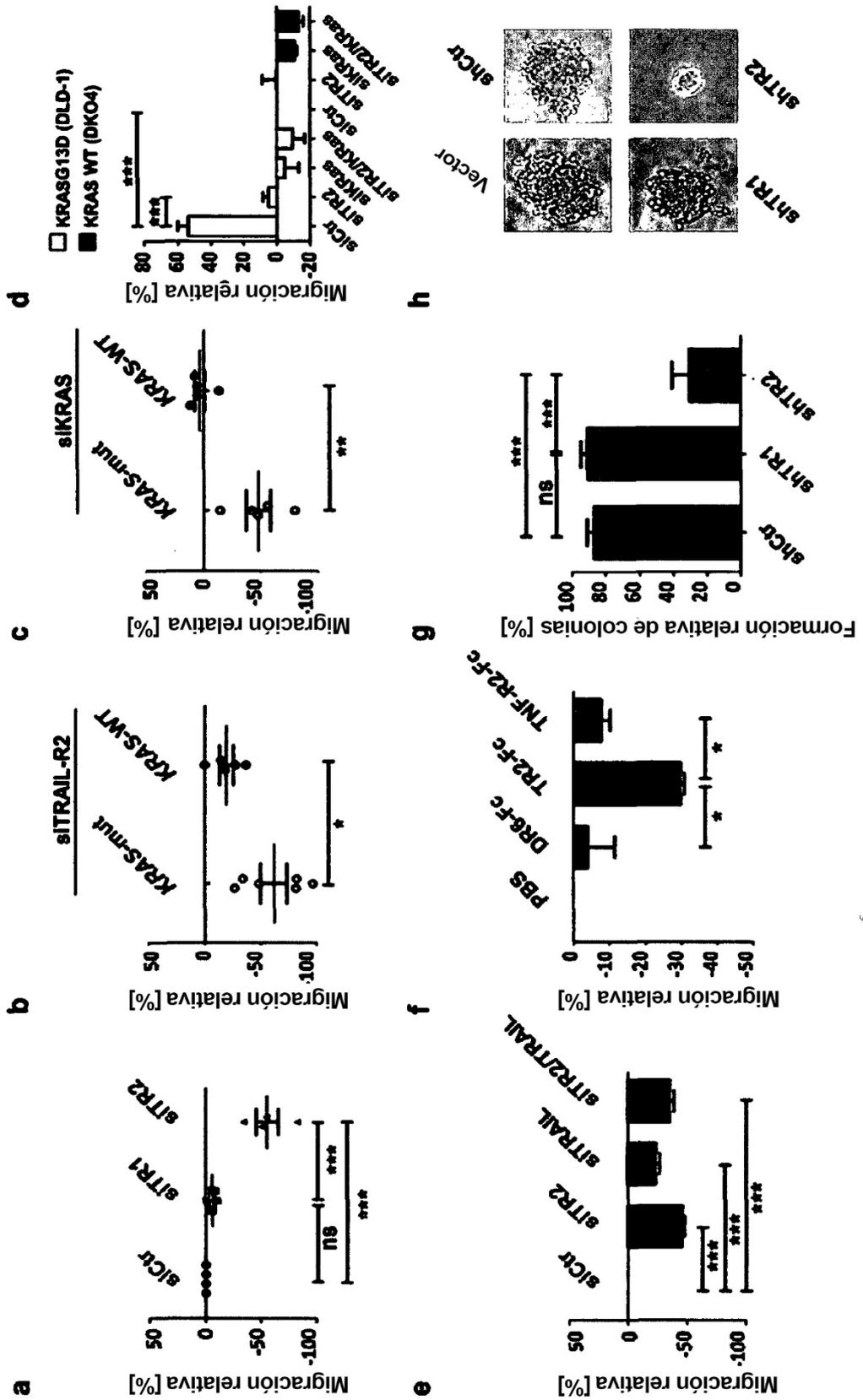


Figura 2

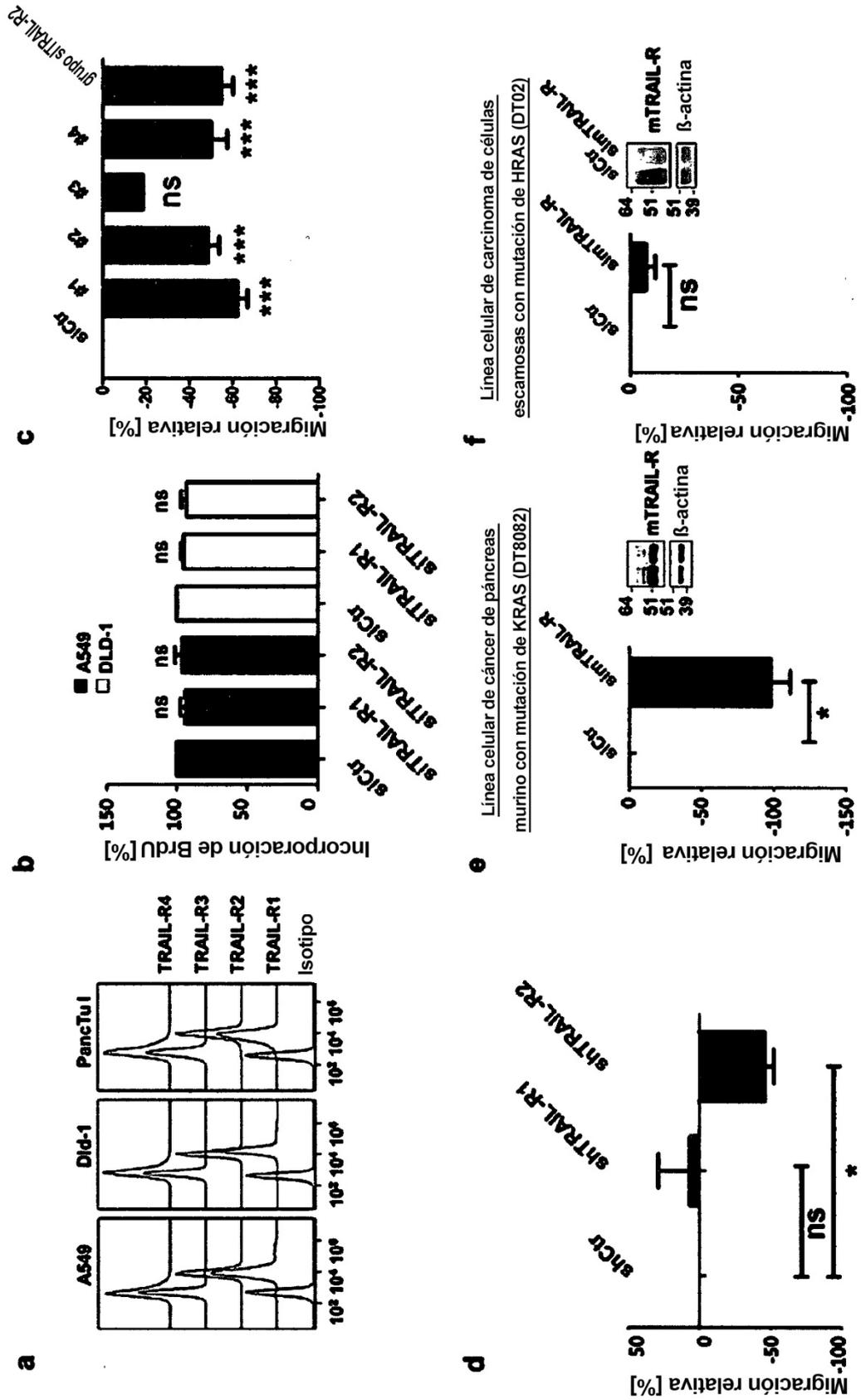


Figura 3

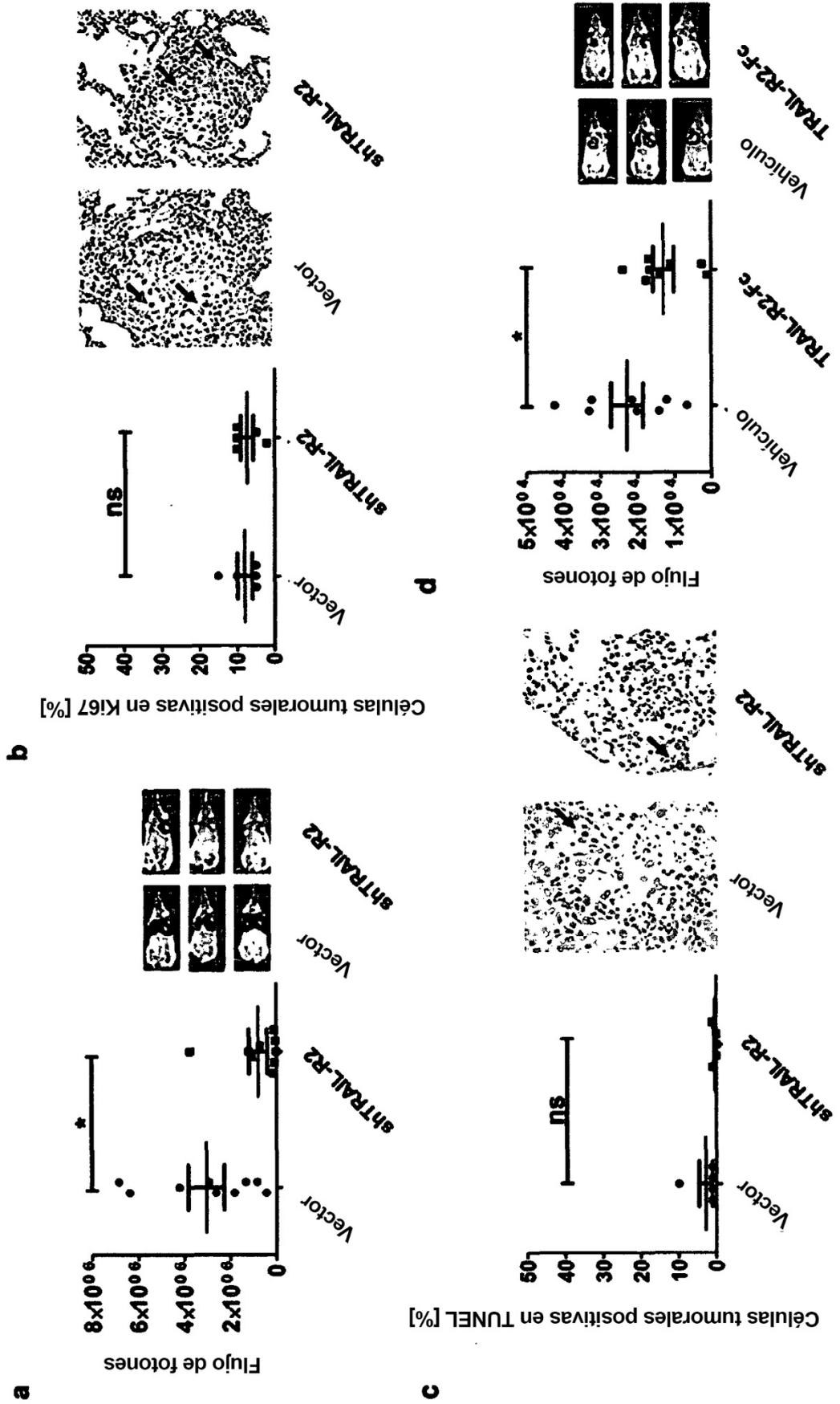


Figura 4

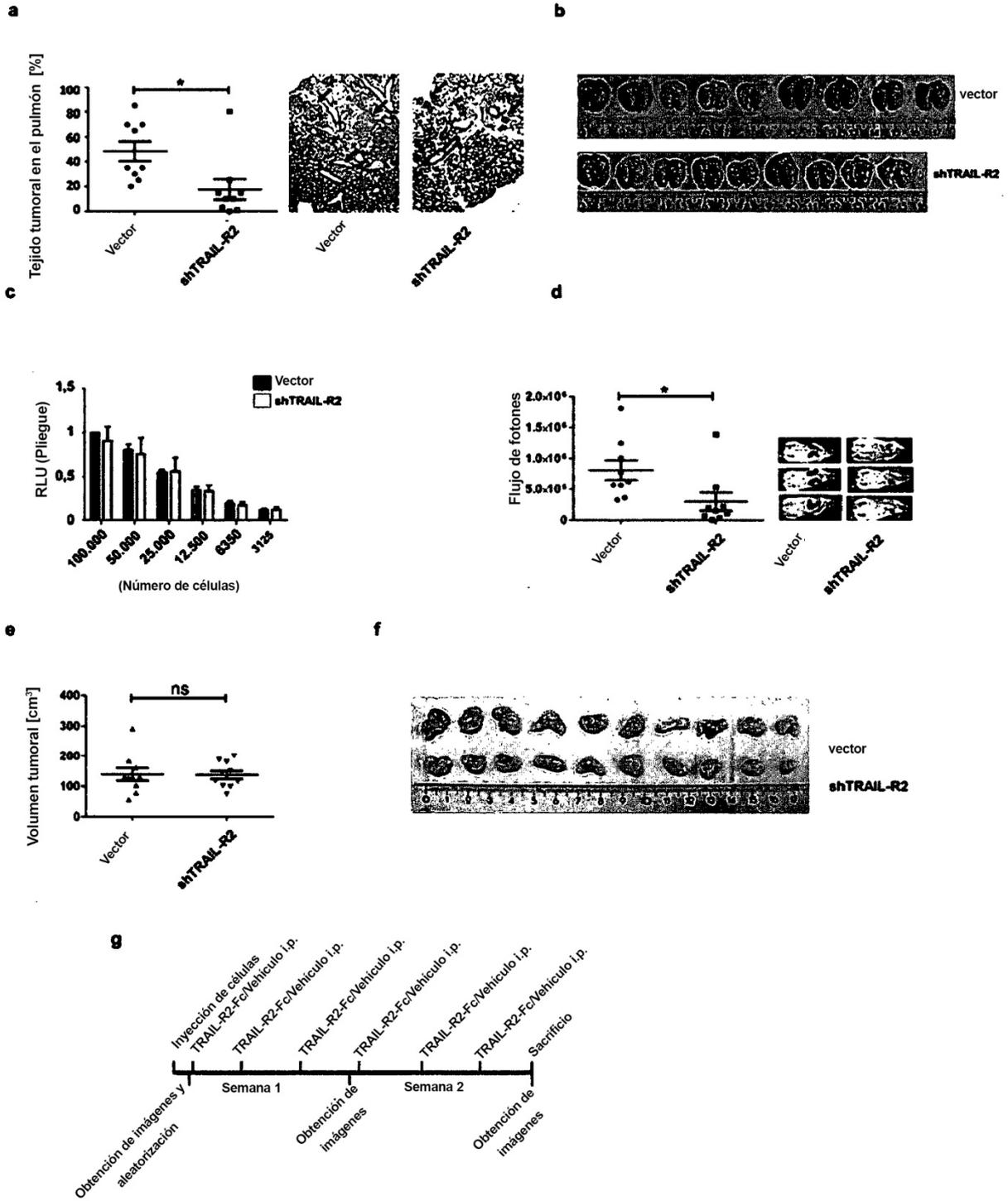


Figura 5

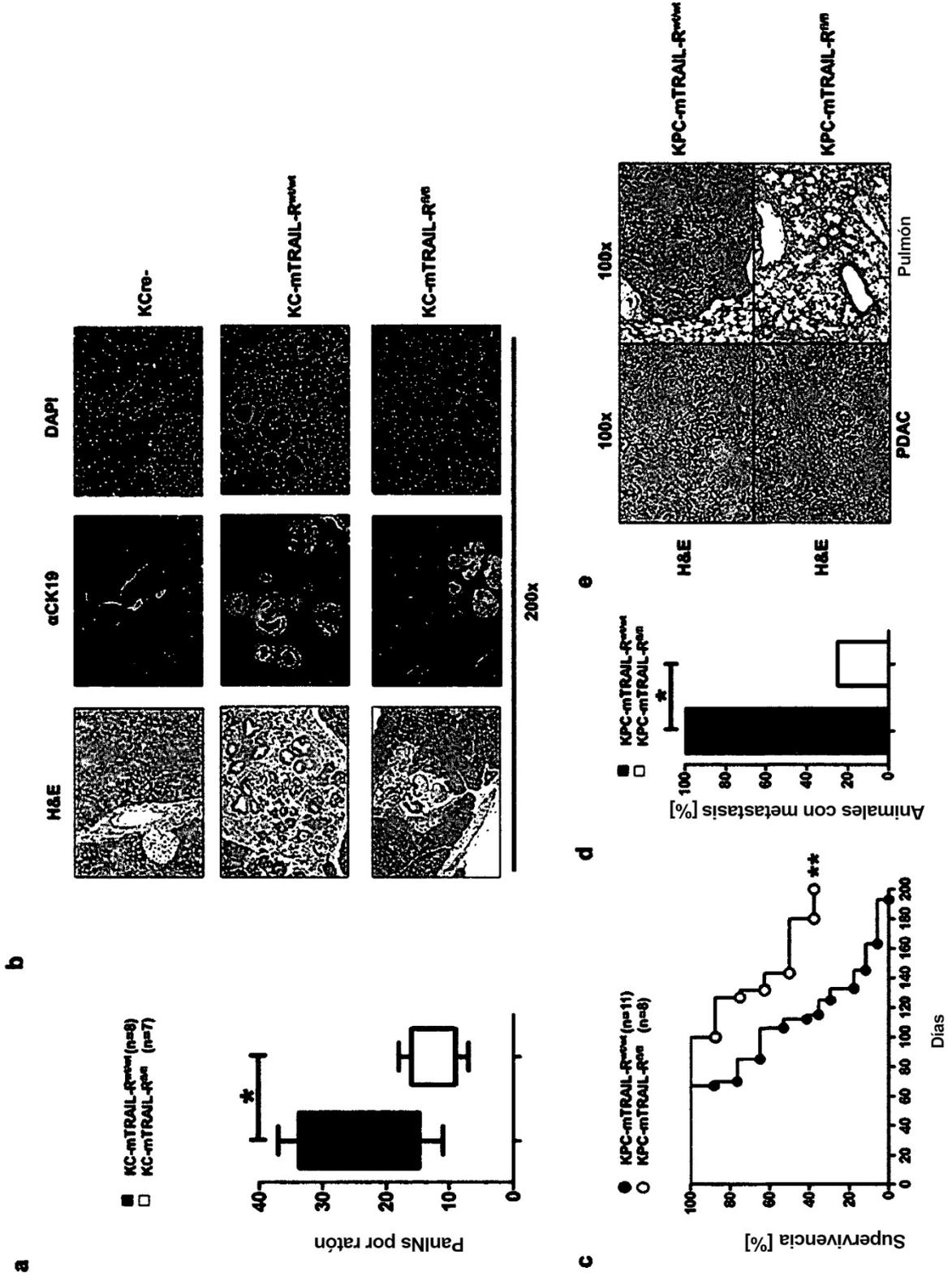
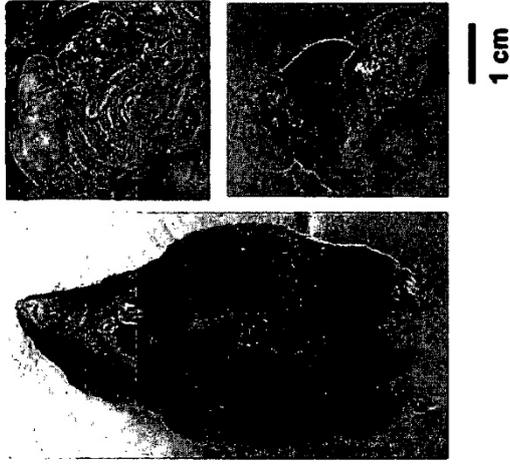


Figura 6

b



a

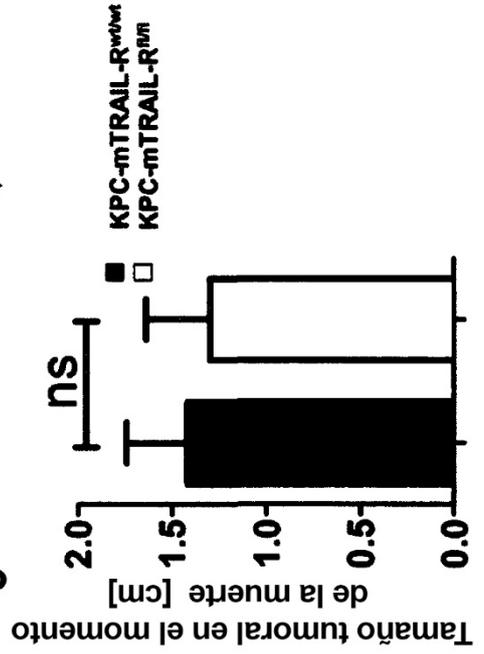
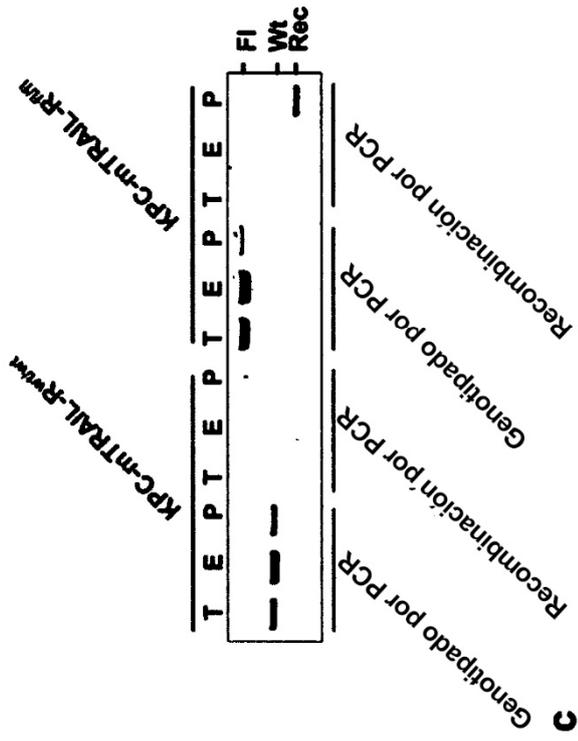


Figura 8

