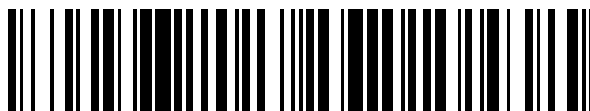


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 429**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2009 E 09783150 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2334303**

54 Título: **Receptor tirosina cinasa TYRO3 como una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

19.09.2008 EP 08305574

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

28.06.2016

73 Titular/es:

INSTITUT CURIE (25.0%)

26, rue d'Ulm

75248 Paris Cedex 05, FR;

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (25.0%);

ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS

(25.0%) y

UNIVERSITE PARIS-EST CRETEIL VAL DE

MARNE (25.0%)

72 Inventor/es:

BERNARD-PIERROT, ISABELLE;

RADVANYI, FRANÇOIS;

ALLORY, YVES y

STRANSKY, NICOLAS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 429 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

Receptor tirosina cinasa TYRO3 como una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con el campo de la medicina, en particular con el tratamiento del cáncer. Se refiere a nuevos usos en el tratamiento del cáncer y a métodos de exploración de moléculas útiles en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 Se produce cáncer cuando la división celular pasa a estar fuera de control y es el resultado del deterioro de una ruta de reparación de DNA, la transformación de genes normales en oncogenes o el mal funcionamiento de genes supresores de tumores. Existen muchas formas diferentes de cáncer. La incidencia de estos cánceres varía, pero representa la segunda mayor causa de mortalidad, después de la enfermedad cardíaca, en la mayoría de los países desarrollados.

15 El cáncer de vejiga es el quinto cáncer en términos de incidencia. Puede aparecer como lesiones superficiales restringidas al urotelio [Ta y carcinoma *in situ* (CIS)] o a la lámina propia (T1) o como lesiones muscularmente invasivas (T2-T4). Hasta la fecha se han descrito dos rutas diferentes de progresión tumoral en el cáncer de vejiga, la ruta Ta y la ruta CIS. Los tumores Ta, que constituyen el 50% de los tumores de vejiga en la primera presentación, son tumores papilares superficiales, normalmente de bajo grado, que no invaden la membrana basal. El carcinoma *in situ* (CIS) es también un tumor superficial que no invade la membrana basal pero es siempre de alto grado. Los tumores Ta, a pesar de la resección quirúrgica asociada o no con una terapia con BCG (bacilo de Calmette-Guerin),
20 mientras que el CIS a menudo progresa hasta tumores T2-T4. En lo relativo a carcinomas de vejiga muscularmente invasivos, el tratamiento estándar es la cistectomía. A pesar de este tratamiento radical, el carcinoma de vejiga muscularmente invasivo sigue siendo una enfermedad mortal para la mayoría de los pacientes.

25 Hasta ahora, aun cuando se han descrito muchas alteraciones cromosómicas recurrentes en el cáncer de vejiga, se ha demostrado que sólo unos pocos genes están implicados en la progresión tumoral (p53, CDKN2A, RB1, E2F3, FGFR3).

En consecuencia, existe la significativa necesidad de un tratamiento apropiado para los tumores de vejiga, en particular de nuevos y más eficaces agentes terapéuticos.

Sumario de la invención

30 Sorprendentemente, los inventores demuestran en esta memoria que TYRO3 está sobreexpresado en varios tipos de tumores, incluyendo los tumores de vejiga, y es responsable de la supervivencia de células tumorales. Además, muestran que se pueden emplear compuestos que inducen inhibición o supresión de TYRO3 para tratar cánceres en que se sobreexpresa TYRO3.

35 La presente invención proporciona nuevos agentes terapéuticos para uso en el tratamiento del cáncer, y en particular del tumor de vejiga.

40 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 para uso en el tratamiento de un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3. En una realización particular, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es seleccionado del grupo que consiste en tumor de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia de células pilosas, cáncer metastásico de próstata, melanoma y cáncer colorrectal. En una realización preferida, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un tumor de vejiga.

45 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 y un vehículo/excipientes farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3. En una realización particular, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es seleccionado del grupo que consiste en tumor de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia de células pilosas, cáncer metastásico de próstata, melanoma y cáncer colorrectal. En una realización preferida, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un tumor de vejiga.

50 El inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3, una molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente en la expresión de TYRO3, un señuelo soluble de TYRO3, y un receptor negativo dominante que presenta un dominio cinasa muerto. En una realización preferida, el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es seleccionado del

grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3, una molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente en la expresión de TYRO3, un señuelo soluble de TYRO3 y un receptor negativo dominante que presenta un dominio cinasa muerto. En una realización particular, el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es un RNAi, un ácido nucleico antisentido o una ribozima que interfiere específicamente en la expresión de TYRO3.

En una realización preferida, el inhibidor es un siRNA, en particular un siRNA que comprende una secuencia de ID. SEC. nº 1.

En otra realización, el inhibidor es un señuelo soluble de TYRO3 que es un receptor TYRO3 recombinante constituido por, al menos, el dominio extracelular del receptor o uno de los dominios (de tipo Ig o de fibronectina) del mismo. En otra realización particular, el señuelo soluble de TYRO3 es un anticuerpo dirigido contra Gas-6.

En una realización, el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 se emplea en combinación con otro ingrediente activo, en particular un fármaco antitumoral. En una realización particular, el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 se emplea en combinación con un tratamiento contra el tumor de vejiga.

La presente invención también se refiere a un método *in vitro* para explorar o identificar una molécula adecuada para tratar un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3, en donde el método comprende las operaciones de (i) poner moléculas candidatas en contacto con células que expresan el receptor TYRO3, y (ii) seleccionar las moléculas que tienen la capacidad para unirse al receptor TYRO3 y/o competir con y/o por un ligando del receptor TYRO3 y/o disminuir la expresión del gen TYRO3 y/o disminuir la fosforilación de los sustratos de TYRO3 o la autofosforilación de TYRO3. En una realización particular, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un tumor de vejiga.

Opcionalmente, estos métodos para explorar o identificar una molécula adecuada para tratar un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 pueden comprender además la operación de administrar *in vitro* la molécula seleccionada a un modelo animal no humano con tumor que sobreexpresa TYRO3 y analizar el efecto sobre la progresión de la enfermedad. En una realización particular, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un tumor de vejiga y el modelo animal no humano con tumor que sobreexpresa TYRO3 es un modelo animal no humano con tumor de vejiga.

Finalmente, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3. En una realización particular, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es seleccionado del grupo que consiste en tumor de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia de células pilosas, cáncer metastásico de próstata, melanoma y cáncer colorrectal. En una realización preferida, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un tumor de vejiga.

Breve descripción de los dibujos

En la Figura 1 se muestra la expresión de TYRO3 en tumores de vejiga y líneas celulares de cáncer de vejiga. Se evaluaron los niveles de expresión de mRNA en tumores de cáncer de vejiga humano usando una micromatriz de DNA Affymetrix U95A (Figura 1A). Las diferencias de expresión entre los diferentes grupos se compararon utilizando una prueba de análisis de varianza (ANOVA) (Figura 1B).

En la Figura 2 se muestra la expresión de GAS6 en tumores de vejiga y líneas celulares de cáncer de vejiga. Se evaluaron los niveles de expresión de mRNA en tumores de cáncer de vejiga humano usando una micromatriz de DNA Affymetrix U95A (Figura 2A) y se compararon las diferencias de expresión entre los diferentes grupos utilizando una prueba de ANOVA (Figura 2B).

En la Figura 3 se muestran los niveles de expresión de mRNA de TYRO3 y GAS6 en las líneas celulares T24, MGH-U3, RT4, KK47, TCCSUP, EJ138, J82 y RT112 de cáncer de vejiga humano y en una línea celular procedente de urotelio normal humano (NHU), evaluados mediante Q-RT-PCR.

En la Figura 4 se muestra la eficacia del silenciamiento de TYRO3 en células MGH-U3. Se transfectaron las células con siRNA 50 nM [siRNA anti-TYRO3 (ID. SEC. nº 1) o siRNA testigo (revuelto, ID. SEC. nº 2)] y se evaluó la eficacia del silenciamiento de TYRO3 72 horas después de la transfección mediante transferencia Western.

En la Figura 5 se muestra un gráfico que representa el efecto de la reducción de actividad de TYRO3 sobre la viabilidad de células de cáncer de vejiga. Después de la transfección, como se describe en la leyenda de la Figura 4, se trataron las células con tripsina 72 horas después de la transfección y se tiñeron con azul de tripano y se contaron las células viables por triplicado utilizando un hematocitómetro Malassez. Los resultados son los valores medios +/- la desviación estándar de dos experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

En la Figura 6 se muestra el efecto de un anticuerpo anti-TYRO3 sobre la viabilidad de células de cáncer de vejiga. Se incubaron las células 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de un anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3 [anti-Rse (N-18), generado en cabra, Santa Cruz Biotechnology] y se midió la viabilidad celular mediante un ensayo con MTT.

5 En la Figura 7 se muestra el efecto de un receptor TYRO3 soluble recombinante sobre la viabilidad celular. Se produjo en bacterias y se purificó el dominio extracelular de TYRO3 (421 aa), compuesto por dos dominios de tipo Ig (aa 1-220) y dos dominios de fibronectina III (aa 220-421). Se incubaron las células 72 horas en presencia de diferentes cantidades de este receptor soluble y se midió la viabilidad celular por incorporación de MTT.

10 En la Figura 8 se muestran los resultados de un ensayo TUNEL [marcación de final de corte mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal (tdt; del inglés, terminal deoxynucleotidyl transferase)] sobre células de cáncer de vejiga transfectadas. Se sembraron 3×10^4 células por pocillo sobre un portaobjetos de vidrio en una placa de 24 pocillos y se transfectaron con siRNA 50 nM. Se evaluó la fragmentación de DNA 72 horas después de la transfección utilizando un kit de detección del ensayo TUNEL (Roche Diagnostics, Meylan, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los inventores analizaron 600 células bajo un microscopio óptico, determinando la razón de células marcadas.

En la Figura 9 se muestra un análisis del ciclo celular por citometría de flujo 72 horas después de la transfección con siRNA. Los resultados se analizaron utilizando una prueba de Fisher; *** $p < 0,001$, * $0,01 < p < 0,05$.

20 En la Figura 10 se muestra un gráfico que representa el efecto de la reducción de actividad de TYRO3 sobre la formación de colonias independiente del anclaje. Se añadieron $2 \cdot 10^4$ células transfectadas con siRNA 50 nM, en medio DMEM complementado con FCS al 10% y agar al 0,3%, a pocillos triplicados que contenían medio y agar al 0,8% en placas de 12 pocillos. Se incubaron las placas durante dos semanas y se calificaron como positivas las colonias con diámetros superiores a 50 μm utilizando un microscopio de contraste de fases provisto de una retícula de medición. Los resultados son los valores medios +/- la desviación estándar de dos experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

25 En la Figura 11 se muestra el efecto de siRNA de TYRO3 sobre el crecimiento de tumores J82 xenoinjertados. Se trataron ratones que portaban tumores, tres veces a la semana, mediante una inyección intraperitoneal de 4 μg de siRNA (testigo o TYRO3) (6 ratones y 12 tumores por grupo) (la primera inyección corresponde al día 0). En el gráfico de la Figura 11A se representan variaciones del volumen tumoral (prueba de la suma de rangos de Wilcoxon: *, $0,05 < p < 0,01$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$). Se han insertado fotografías de tumores representativos observados al final del tratamiento. Los tumores de la línea superior son los de ratones tratados con siRNA testigo. Los tumores de la línea inferior son los de ratones tratados con siRNA de TYRO3. Los tumores se pesaron al final del experimento (Figura 11B).

35 En la Figura 12 se muestra el efecto de siRNA de TYRO3 sobre el crecimiento de tumores J82 xenoinjertados. Se trataron ratones que portaban tumores, tres veces a la semana, mediante una inyección intraperitoneal de 4 μg de siRNA (testigo o TYRO3) (6 ratones y 12 tumores por grupo) (la primera inyección corresponde al día 0). En el gráfico de la Figura 12A se representan variaciones del volumen tumoral (prueba de la suma de rangos de Wilcoxon: *, $0,05 < p < 0,01$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$). Se han insertado fotografías de tumores representativos observados al final del tratamiento. Los tumores de la línea superior son los de ratones tratados con siRNA de TYRO3. Los tumores de la línea central son los de ratones tratados con siRNA testigo. Los tumores de la línea inferior son los de ratones tratados con PBS. Los tumores se pesaron al final del experimento (Figura 12B).

La Figura 13 es un gráfico que muestra los niveles de mRNA de TYRO3 para xenoinjertos de MGH-U3, 3 días después de la última inyección de siRNA, divididos por los niveles de mRNA de proteína ligante de TATA (TBP; del inglés, TATA binding protein) +/- la desviación estándar en tumores tratados y testigo, según se evalúa mediante Q-RT-PCR.

45 En la Figura 14 se muestra el efecto de un receptor TYRO3 soluble recombinante que consiste en el dominio extracelular recombinante de TYRO3, producido en bacterias, sobre el crecimiento de tumores MGH-U3 xenoinjertados. Se trataron ratones que portaban tumores, tres veces a la semana, mediante una inyección intratumoral de 80 μg de receptor TYRO3 soluble o PBS (7 ratones y 14 tumores por grupo) (la primera inyección corresponde al día 0). En el gráfico de la Figura 14A se representan variaciones del volumen tumoral (prueba de la suma de rangos de Wilcoxon: *, $0,05 < p < 0,01$; **, $0,01 < p < 0,001$; ***, $p < 0,001$). En la Figura 14B se muestran fotografías de tumores representativos observados al final del tratamiento.

55 En la Figura 15 se muestran los resultados de un ensayo TUNEL sobre tumores MGH-U3 xenoinjertados, tratados con receptor TYRO3 soluble o PBS. 18 días después del comienzo del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se embebieron los tumores en parafina. Luego se evaluó la fragmentación de DNA utilizando un kit de detección del ensayo TUNEL [marcación de final de corte mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal (tdt)] (Roche Diagnostics, Meylan, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se muestran fotografías de campos

representativos observados.

En la Figura 16 se muestra la sobreexpresión de TYRO3 en diferentes cánceres. Análisis de expresión diferencial de TYRO3 en tumores humanos usando la página web de Oncomine (Rhodes et al., 2004). Se representan estudios (Figura 16A) que muestran una significativa suprarregulación ($p < 0,01$) de los niveles de expresión del gen TYRO3 en tejidos tumorales (gris, sección derecha) en comparación con tejidos normales (blanco, sección izquierda). En la Figura 16B se proporcionan detalles de los datos empleados para este análisis.

En la Figura 17 se muestran gráficos de la expresión del gen TYRO3 a través de un gran espectro de tejidos normales (Figura 16B), extraídos de la base de datos GeneSapiens (Kilpinen et al., 2008).

En la Figura 18 se muestran gráficos de la expresión del gen TYRO3 a través de un gran espectro de tejidos tumorales, extraídos de la base de datos GeneSapiens (Kilpinen et al., 2008).

Descripción detallada de la invención

Al analizar el transcriptoma en una serie de 80 carcinomas de vejiga, 5 urotelios de vejiga normales y 10 líneas celulares de tumor de vejiga, los inventores:

- han identificado un receptor tirosina cinasa TYRO3 sobreexpresado en casi el 70% de los carcinomas de vejiga en comparación con las muestras de urotelio normal, siendo esta sobreexpresión independiente de la fase y el grado;

- se han dado cuenta de que uno de los ligandos de TYRO3, GAS6, está también sobreexpresado en el carcinoma invasivo en comparación con el urotelio normal y los tumores superficiales; y

- han demostrado funcionalmente la importancia de TYRO3 en la supervivencia de células de tumores de vejiga.

Un análisis por QPCR permitió validar los datos transcriptómicos de Affymetrix y, a partir de ellos, mostrar una sobreexpresión de TYRO3 en la mayoría de las muestras de tumor de vejiga. Una hibridación *in situ* permitió demostrar que TYRO3 es expresado por células epiteliales de tumor de vejiga mientras que GAS6 es principalmente expresado por células estromales. Estudios funcionales sobre TYRO3 en cuatro líneas celulares de tumor de vejiga (dos que sólo expresan TYRO3 y dos que expresan tanto TYRO3 como GAS6) utilizando siRNA para reducir la expresión génica o un receptor soluble TYRO3 recombinante (constituido por el dominio extracelular del receptor) mostraron que TYRO3 era necesario para la supervivencia *in vitro* de células de cáncer de vejiga. Estos resultados se confirmaron *in vivo* utilizando una línea celular xenoinjertada procedente de tumor de vejiga humano. En realidad, la inactivación de TYRO3 1) inhibe la supervivencia celular al inducir apoptosis celular; 2) inhibe el crecimiento independiente del anclaje, lo que demuestra que TYRO3 regula la supervivencia celular de células clonogénicas; y 3) inhibe el crecimiento de células de tumor de vejiga xenoinjertadas en ratones desnudos y, aún más, reduce el tamaño del tumor. Resulta interesante que los inventores observaran el mismo efecto *in vitro* a través de la inhibición de la actividad de TYRO3 utilizando un anticuerpo policlonal anti-TYRO3 dirigido contra su dominio extracelular.

Además, los inventores demostraron que TYRO3 no sólo está sobreexpresado en tumores de vejiga sino también en otros diferentes tipos de cáncer, tales como linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia de células pilosas, cáncer metastásico de próstata, melanoma y cáncer colorrectal.

En consecuencia, los inventores han demostrado que TYRO3 es una tirosina cinasa sobreexpresada en la mayoría de los tumores de vejiga y en otros diversos tipos de cánceres y que induce la supervivencia de células tumorales. Por lo tanto, la presente invención proporciona una nueva e interesante diana terapéutica para el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 y, en particular, para el cáncer de vejiga.

Hasta ahora se había descrito que TYRO3 estaba sobreexpresado o coexpresado con su ligando en unos pocos tipos tumorales humanos [leiomioma uterino (Sun et al., 2003a), cánceres uterinos de endometrio y endometriosis ovárica (Sun et al., 2002; Sun et al., 2003b), y carcinoma pulmonar (Wimmel et al., 1999)], pero nunca se había sugerido ni demostrado su papel en la progresión de tumores ni, especialmente, en la supervivencia de células tumorales.

Se ha sugerido su función oncogénica ya que su expresión transformaba fibroblastos Rat-2 y fibroblastos RatB1 (Lai et al., 2004; Taylor et al., 1995). Además, se han sugerido también estas propiedades oncogénicas porque un receptor híbrido constituido por la parte extracelular del receptor de EGF y la parte intracelular de TYRO3 puede transformar células NIH3T3 en presencia de EGF (Lan et al., 2000).

Sin embargo, la potencial función oncogénica de TYRO3 no permite describir ni sugerir la función de este receptor en la supervivencia de células tumorales.

Recientemente, en una solicitud de patente retirada (WO/2005/000207) de Kiener et al. se sugiere que TYRO3 es el receptor del factor de crecimiento derivado de células de cáncer de próstata (PCDGF; del inglés, prostate cancer cell derived growth factor). Puesto que el PCDGF está sobreexpresado en diferentes cánceres, este documento sugiere que la inhibición de la unión de PCDGF a TYRO3 podría ser una estrategia terapéutica en diversos cánceres en que se sobreexpresa PCDGF. Sin embargo, este documento no contiene ningún dato que respalde su estrategia. En realidad, no hay ningún dato que demuestre que TYRO3 es el receptor de PCDGF y que una molécula que inhiba la potencial unión de PCDGF con TYRO3 pueda ejercer un efecto sobre células cancerosas.

En consecuencia, se ha descrito y demostrado por vez primera el papel de TYRO3 en la supervivencia de células tumorales, y este papel proporciona un nuevo medio para tratar un cáncer existente en que se sobreexpresa TYRO3, y en particular un tumor de vejiga.

Los receptores tirosina cinasa están compuestos por un dominio extracelular, que es capaz de unirse a un ligando específico, un dominio transmembranal y un dominio catalítico intracelular que es capaz de unirse a, y fosforilar, sustratos intracelulares seleccionados. La unión de un ligando a la región extracelular causa una serie de reordenamientos estructurales en el receptor tirosina cinasa que conducen a su activación enzimática, la cual desencadena una cascada de sucesos a través de la fosforilación de proteínas intracelulares que finalmente transducen la señal extracelular al núcleo causando cambios en la expresión génica.

El receptor tirosina cinasa TYRO3 es un miembro de la familia AXL/Ufo/Mer de receptores tirosina cinasa. El TYRO3 es también conocido como BYK, Brt, Dtk, Rse, Sky y Tif. Se ha descrito que el gen 6 específico de la detención del crecimiento (GAS6; del inglés, growth arrest specific gene-6) y la proteína S activan la actividad tirosina cinasa de TYRO3.

Las secuencias polinucleotídica y de aminoácidos son bien conocidas en la técnica. Son secuencias de referencia los números de acceso MN_006293.2 y NP_006284.2, respectivamente, de Genbank. La entrada de referencia para el TYRO3 humano en la base de datos UniGene del transcriptoma es Hs.381282.

En la presente invención, un "inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3" es una molécula que inhibe o reduce la actividad del receptor TYRO3. De este modo, el inhibidor induce la supresión o reducción de la transmisión de señales extracelulares a la célula a través del receptor TYRO3.

La actividad del receptor tirosina cinasa TYRO3 puede ser fácilmente examinada mediante cualquier método conocido en la técnica. Un primer ensayo puede ser la determinación de la capacidad del inhibidor para unirse al receptor TYRO3. Un segundo ensayo puede ser la determinación de la capacidad del inhibidor para competir con un ligando del receptor TYRO3 por la unión de este receptor o de este ligando. Un tercer ensayo puede ser la determinación de la capacidad del inhibidor para disminuir el nivel de expresión de TYRO3. Un cuarto ensayo puede ser la determinación de la capacidad del inhibidor para disminuir la fosforilación de los sustratos de TYRO3 o la autofosforilación de TYRO3. Estos diferentes métodos se describen más adelante en este documento y se pueden combinar.

La inhibición puede ser debida a la unión de una molécula al dominio extracelular del receptor. En este caso, el inhibidor puede ser un antagonista que se une al dominio de unión a ligandos o a otro dominio del receptor, o una molécula que modifica la actividad del receptor mediante impedimento estérico o modificación. Este inhibidor puede ser, por ejemplo, un aptámero o un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular del receptor. Se puede determinar la actividad inhibitoria por medio de un ensayo de unión, un ensayo de unión competitiva o un ensayo de fosforilación.

La inhibición puede ser también debida a la reducción o supresión de la expresión del gen que codifica el receptor usando, por ejemplo, un RNAi, ácido nucleico antisentido o ribozima específicos, lo que induce una disminución del número de receptores en la superficie celular y, por lo tanto, una reducción de la transmisión de señales extracelulares. Se puede examinar la actividad inhibitoria a través de la medición del nivel de expresión de TYRO3, a nivel de proteína o a nivel de RNA. También se puede examinar la actividad inhibitoria a través de la fosforilación de TYRO3 o de un sustrato de TYRO3.

El uso de señuelos que se unen a ligandos del receptor TYRO3 puede también inducir la reducción o supresión de la actividad de este receptor mediante la competición por estos ligandos. En realidad, estos señuelos atrapan ligandos de TYRO3 y, en consecuencia, disminuyen la concentración de ligandos disponibles para la activación de TYRO3. Estos señuelos se pueden desplegar en la membrana en forma de receptores negativos dominantes, o en el fluido extracelular en forma de receptores solubles. Estos señuelos pueden ser también anticuerpos dirigidos contra ligandos de TYRO3. Se puede determinar la actividad inhibitoria a través de un ensayo de competición para determinar la disminución de unión entre el receptor TYRO3 funcional y su ligando. También se puede examinar la actividad inhibitoria a través de la fosforilación de TYRO3 o de un sustrato de TYRO3.

En realizaciones particulares de la presente invención, el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es

preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3, una molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente en la expresión de TYRO3, un receptor negativo dominante que presenta un dominio cinasa muerto, y un señuelo soluble de TYRO3.

5 En una realización preferida, el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente en la expresión de TYRO3, un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3, un receptor negativo dominante que presenta un dominio cinasa muerto, y un señuelo soluble de TYRO3.

10 Como se emplea en esta memoria, con el término "anticuerpo" se pretende hacer referencia, en términos generales, a cualquier agente ligante inmunológico tal como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE y a un anticuerpo humanizado o quimérico. En ciertas realizaciones, se prefieren IgG y/o IgM porque son los anticuerpos más comunes en el estado fisiológico y son los fabricados más fácilmente. El término "anticuerpo" se emplea para referirse a cualquier molécula de tipo anticuerpo que tiene una región ligante de antígenos, e incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de un solo dominio (DABs), Fv, Fv de cadena única (scFv; del inglés, single chain Fv), y similares. Las técnicas para preparar y emplear diversas construcciones y fragmentos basados en anticuerpos son bien conocidas en este campo técnico. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son también bien conocidos en este campo técnico (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988).

20 Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en que las regiones constantes y variables de armazón de una o más inmunoglobulinas humanas están fusionadas con la región ligante, por ejemplo, la CDR, de una inmunoglobulina animal. Los anticuerpos "humanizados" contemplados en la presente invención son anticuerpos quiméricos de ratón, rata u otra especie que portan dominios de regiones constantes y/o variables humanas, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos recombinantes y genéticamente modificados y fragmentos de los mismos. Dichos anticuerpos humanizados se diseñan para mantener la especificidad ligante del anticuerpo no humano a partir del cual proceden las regiones ligantes, pero para evitar una reacción inmune contra el anticuerpo no humano.

25 Un anticuerpo "quimérico" es una molécula de anticuerpo en que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o cambiada de modo que el sitio ligante de antígenos (región variable) está unido a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o a una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, tal como, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, reemplazada o cambiada por una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada.

30 Particularmente, con la expresión "anticuerpo contra el dominio extracelular de TYRO3" se designa un anticuerpo como el anteriormente descrito que es capaz de unirse al dominio extracelular del receptor tirosina cinasa TYRO3 y bloquear o reducir su actividad. Esta inhibición puede ser debida a un impedimento estérico o modificación que evita la unión del ligando.

35 En una realización preferida, el anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3 es un anticuerpo anti-Rse (N-18) (Santa Cruz Biotechnology).

40 Como se emplea en esta memoria, un "receptor negativo dominante que presenta un dominio cinasa muerto" es un receptor que es capaz de unirse a un ligando pero es defectuoso para la transmisión de la señal. En consecuencia, la sobreexpresión de un receptor negativo dominante afecta a la señalización del receptor al bloquear la transducción de señales. La presencia de dicho receptor negativo dominante en la superficie celular induce una competición por el ligando que disminuye la cantidad de ligando disponible para el receptor activo y, de este modo, evita la activación de este receptor. En la presente invención, el receptor negativo dominante TYRO3 presenta un dominio extracelular operativo que se une a un ligando de TYRO3, y un dominio cinasa no operativo que es incapaz de transmitir la señal dentro de la célula por medio de la fosforilación de sustratos intracelulares.

45 Como se emplea en esta memoria, con la expresión "señuelo soluble de TYRO3" se designa una molécula extracelular que es capaz de unirse a un ligando de TYRO3 y, de este modo, inducir la reducción o supresión de la actividad del receptor TYRO3 mediante competición por sus ligandos o mediante heterodimerización con el receptor endógeno de tipo silvestre. Este señuelo soluble puede estar constituido por cualquier péptido que tenga la capacidad para unirse a un ligando del receptor TYRO3 o al dominio extracelular del receptor.

50 En una realización, el señuelo soluble de TYRO3 es un receptor TYRO3 recombinante constituido por el dominio extracelular del receptor, o un fragmento del mismo capaz de unirse a un ligando de TYRO3, o un dominio extracelular de TYRO3 (por ejemplo, un dominio de tipo Ig o de fibronectina). En una realización preferida, el señuelo soluble de TYRO3 es el dominio extracelular completo del receptor TYRO3. El dominio extracelular de TYRO3 (421 aa) está compuesto por dos dominios de tipo Ig (aa 1-220) y dos dominios de fibronectina III (aa 220-421). En otra realización, el señuelo soluble de TYRO3 es un receptor TYRO3 recombinante constituido por uno o dos dominios de tipo Ig o por uno o dos dominios de fibronectina III. Si es necesario, los dominios del receptor TYRO3 pueden ser copulados con un fragmento Fc para estabilizar el receptor.

Los inhibidores del receptor tirosina cinasa TYRO3 de la invención también pueden ser moléculas de ácido nucleico. La expresión "molécula de ácido nucleico" incluye, pero no se limita a, moléculas de RNAi, ácido nucleico antisentido y ribozima.

5 En la presente invención, una "molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente en la expresión de TYRO3" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de reducir o suprimir de un modo específico la expresión del gen que codifica el receptor TYRO3.

10 La expresión "RNAi" o "RNA interferente" significa todo RNA que es capaz de infrarregular la expresión de la proteína diana. Abarca moléculas de RNA interferente pequeño (siRNA; del inglés, small interfering RNA), RNA de doble cadena (dsRNA; del inglés, double-stranded RNA), RNA de cadena sencilla (ssRNA; del inglés, single-stranded RNA), microRNA (miRNA) y RNA corto en horquilla (shRNA; del inglés, short hairpin RNA). La interferencia de RNA designa un fenómeno mediante el cual dsRNA suprime específicamente la expresión de un gen diana a nivel postraduccional. En condiciones normales, la interferencia de RNA es iniciada por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) con una longitud de varios miles de pares de bases. *In vivo*, el dsRNA introducido en una célula es escindido en una mezcla de pequeñas moléculas de dsRNA llamadas siRNA. La enzima que cataliza la escisión, Dicer, es una endo-RNasa que contiene dominios de RNasa III (Bernstein, Caudy et al., 2001). En células de mamífero, los siRNAs producidos por Dicer tienen una longitud de 21-23 pares de bases, con una secuencia dúplex de 19 o 20 nucleótidos, salientes 3' de dos nucleótidos y extremos de 5'-trifosfato (Zamore, Tuschli et al., 2000; Elbashir, Lendeckel et al., 2001; Elbashir, Martinez et al., 2001).

20 En un número de patentes y solicitudes de patente, por ejemplo, los documentos WO 99/32619, US 20040053876, US 20040102408 y WO 2004/007718, se ha descrito, en términos generales, el uso de moléculas de siRNA para inhibir la expresión génica.

25 Se diseñan normalmente siRNAs contra una región de 50-100 nucleótidos cadena abajo del codón iniciador de la traducción, mientras que se evitan normalmente las regiones no traducidas 5'-UTR y 3'-UTR. La secuencia diana de siRNA escogida debería ser sometida a una búsqueda BLAST frente a una base de datos de ESTs para asegurar que se apunta al único gen deseado. Se dispone comercialmente de varios productos para facilitar la preparación y el uso de siRNA.

En una realización preferida, la molécula de RNAi es un siRNA con una longitud de al menos aproximadamente 15-50 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 20-30 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 20-25 nucleótidos.

30 En una realización particular, la molécula de siRNA comprende la secuencia de ID. SEC. n° 1.

35 El RNAi puede comprender RNA de origen natural, RNA sintético o RNA recombinantemente producido, así como RNA alterado que difiere del RNA de origen natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al extremo de la molécula o a uno o más nucleótidos internos del RNAi, incluyendo modificaciones que hagan al RNAi resistente a la digestión por nucleasas.

40 Los RNAi se pueden administrar en forma libre (desnuda) o mediante el uso de sistemas de suministro que potencien la estabilidad y/o el direccionamiento, tales como, por ejemplo, liposomas, o incorporados a otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, microesferas bioadhesivas o vectores proteicos (documento WO 00/53722), o en combinación con un péptido catiónico (documento US 2007275923). También se pueden administrar en forma de sus precursores o de DNAs de codificación.

En una realización particular, se encapsulan RNAi dentro de vesículas, preferiblemente dentro de liposomas.

45 También se puede utilizar ácido nucleico antisentido para infrarregular la expresión del receptor TYRO3. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario de la totalidad o parte de un ácido nucleico sentido que codifica un polipéptido de receptor TYRO3, por ejemplo, complementario de la cadena de codificación de una molécula de cDNA de doble cadena o complementario de una secuencia de mRNA, y se cree que interfiere en la traducción del mRNA diana.

En una realización preferida, el ácido nucleico antisentido es una molécula de RNA complementaria de un mRNA diana que codifica un polipéptido de receptor TYRO3.

50 Un ácido nucleico antisentido puede tener, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos. Particularmente, las moléculas de RNA antisentido tienen normalmente una longitud de 18-50 nucleótidos.

Se puede construir un ácido nucleico antisentido para uso en el método de la invención utilizando reacciones de

síntesis química y ligación enzimática, empleando procedimientos conocidos en la técnica. Particularmente, el RNA antisentido puede ser químicamente sintetizado, producido por transcripción *in vitro* de moldes lineales (por ejemplo, productos de PCR) o circulares (por ejemplo, vectores víricos o no víricos), o producido por transcripción *in vivo* de vectores víricos o no víricos.

5 El ácido nucleico antisentido puede ser modificado para que tenga una estabilidad potenciada, resistencia a nucleasas, especificidad por la diana y propiedades farmacológicas mejoradas. Por ejemplo, el ácido nucleico antisentido puede incluir nucleótidos modificados, diseñados para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos por acridina.

10 También se pueden emplear moléculas de ribozima para disminuir los niveles de receptor tirosina cinasa TYRO3 funcional. Las ribozimas son moléculas de RNA catalíticas con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico de cadena sencilla, tal como un mRNA, con el que tienen una región complementaria. De esta manera, se pueden emplear ribozimas para escindir catalíticamente transcritos de mRNA con objeto de inhibir así la traducción de la proteína codificada por el mRNA. Se pueden diseñar, producir y administrar moléculas de ribozima
15 específicas para receptor tirosina cinasa TYRO3 funcional mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Fanning y Symonds, 2006, en donde se revisa el uso terapéutico de ribozimas de cabeza de martillo y RNA pequeño en horquilla).

Los términos "cáncer" y "tumor", como se emplean en esta memoria, se refieren a la presencia de células que poseen características típicas de células causantes de cáncer, tales como proliferación incontrolada, inmortalidad,
20 potencial metastásico y ciertos rasgos morfológicos característicos. Estos términos se refieren a cualquier tipo de malignidad (malignidad primaria o metástasis).

La expresión "cáncer en que se sobreexpresa TYRO3", como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier tipo de cáncer o tumor en que TYRO3 está suprarregulado. El nivel de expresión de TYRO3 puede ser determinado en una muestra de cáncer mediante una diversidad de técnicas bien conocidas por la persona experta. El nivel de
25 expresión de TYRO3 puede ser determinado midiendo la cantidad de proteína TYRO3 o de mRNA TYRO3 o evaluando la actividad de TYRO3. La expresión de TYRO3 puede ser examinada mediante RT-PCR cuantitativa o utilizando cualquier método conocido por la persona experta en la técnica. La expresión de TYRO3 en el tejido tumoral debería ser comparada con la expresión en líneas celulares proliferativas normales, preferiblemente con la de células normales procedentes del mismo tejido que el del tumor. En una realización particular, el cáncer en que
30 se sobreexpresa TYRO3 es seleccionado del grupo que consiste en tumor de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia de células pilosas, cáncer metastásico de próstata, melanoma y cáncer colorrectal. En una realización preferida, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un tumor de vejiga.

Por "tumor de vejiga" se quiere significar en esta memoria tumor de vejiga urinaria, cáncer de vejiga o cáncer de
35 vejiga urinaria, y neoplasia de vejiga o neoplasia de vejiga urinaria. Un tumor de vejiga puede ser un carcinoma de vejiga o un adenoma de vejiga. El sistema de desarrollo de fases más común para los tumores de vejiga es el sistema TNM (tumor, ganglio, metástasis; del inglés, tumor, node, metastasis). Este sistema de desarrollo de fases tiene en consideración a qué profundidad ha crecido el tumor en la vejiga, si hay cáncer en los ganglios linfáticos y si el cáncer se ha propagado a cualquier otra parte del cuerpo. En una realización preferida, el tumor de vejiga es un
40 carcinoma de vejiga. En una realización preferida, el carcinoma de vejiga que se va a tratar está en una fase T. Además, los carcinomas de vejiga de fase T pueden tener subfases:

CIS – sólo se detectan células cancerosas muy precoces en la capa más interna del epitelio de la vejiga;

Ta – el cáncer está justo en la capa más interna del epitelio de la vejiga;

T1 – el cáncer ha comenzado a desarrollarse en el tejido conjuntivo por debajo del epitelio de la vejiga;

45 T2 – el cáncer se ha desarrollado a través del tejido conjuntivo en el músculo;

T2a – el cáncer se ha desarrollado en el músculo superficial;

T2b – el cáncer se ha desarrollado en el músculo más profundo;

T3 – el cáncer se ha desarrollado a través del músculo en la capa adiposa;

T3a – el cáncer de la capa adiposa sólo se puede ver bajo un microscopio;

50 T3b – el cáncer de la capa adiposa se puede ver mediante ensayos o lo puede notar el médico;

T4 – el cáncer se ha propagado fuera de la vejiga;

T4a – el cáncer se ha propagado a la próstata, el útero o la vagina;

T4b – el cáncer se ha propagado a la pared de la pelvis y el abdomen.

5 En consecuencia, el tumor o carcinoma de vejiga que puede ser tratado mediante la presente invención puede ser superficial (Ta, T1) o invasivo (de T2 a T4). En una realización particular, el carcinoma de vejiga que puede ser tratado mediante la presente invención puede ser de cualquiera y todas las subfases T.

En una realización preferida, se examina una muestra del sujeto que se va a tratar, en particular una muestra de tumor de vejiga, en cuanto a la sobreexpresión de TYRO3. En consecuencia, el tratamiento con el inhibidor de TYRO3 es más particularmente apropiado para un sujeto que tiene un tumor que sobreexpresa TYRO3, en particular un tumor de vejiga que sobreexpresa TYRO3.

10 Como se emplea en esta memoria, el término "tratamiento" de una enfermedad se refiere a cualquier acto destinado a prolongar el tiempo de vida de los pacientes, tal como terapia y retraso de la enfermedad. El tratamiento puede ser diseñado para erradicar el tumor, detener la progresión del tumor, evitar la aparición de metástasis, promover la regresión del tumor y/o evitar una invasión muscular del cáncer. El paciente que se va a tratar es cualquier animal mamífero, preferiblemente un ser humano.

15 El tratamiento del cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 con una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede asociar con otra terapia, tal como cirugía, terapia por radiación u otra quimioterapia.

Mediante una "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere significar una cantidad de agente terapéutico, un inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3, administrada un paciente que es suficiente para constituir un tratamiento de un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 como el anteriormente definido.

20 La composición farmacéutica que comprende el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 se formula de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar [véanse, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20ª edición), redactado por A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, y "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", redactado por J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York] conocida por una persona experta en la técnica.

25 Las composiciones farmacéuticas posibles incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, intravesical, tópica (incluyendo transdérmica, bucal y sublingual) o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Para estas formulaciones se puede utilizar un excipiente convencional de acuerdo con técnicas bien conocidas por los expertos en este campo técnico.

30 Las composiciones para administración parenteral son generalmente disoluciones o suspensiones estériles y fisiológicamente compatibles que pueden ser opcionalmente preparadas inmediatamente antes de su uso a partir de una forma sólida o liofilizada. Se pueden disolver agentes adyuvantes tales como agentes anestésicos locales, conservantes y tampones en el vehículo y se puede incluir en la composición un agente tensioactivo o humectante para facilitar la distribución uniforme del ingrediente activo.

35 Para administración oral, la composición puede ser formulada en formas de dosificación oral convencionales tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos y preparaciones líquidas tales como jarabes, elixires y gotas concentradas. Se pueden emplear vehículos o diluyentes sólidos atóxicos que incluyen, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares de calidad farmacéutica. Para las tabletas comprimidas también son necesarios agentes aglutinantes, que son agentes que imparten cualidades cohesivas a los materiales pulverulentos. Como agentes
40 aglutinantes se pueden utilizar, por ejemplo, almidón, gelatina, azúcares tales como lactosa y dextrosa, y gomas naturales o sintéticas. También son necesarios agentes disgregantes en las tabletas para facilitar la descomposición de la tableta. Los agentes disgregantes incluyen almidones, arcillas, celulosas, alginas, gomas y polímeros reticulados. Además, también se incluyen lubricantes y agentes mejoradores de la fluencia en las tabletas para prevenir la adhesión del material de la tableta a superficies en el proceso de fabricación y para mejorar las
45 características de fluencia del material pulverulento durante la fabricación. El dióxido de silicio coloidal es muy comúnmente empleado como agente mejorador de la fluencia, y compuestos tales como el talco y ácidos esteáricos son muy comúnmente empleados como lubricantes.

50 Para administración transdérmica, la composición puede ser formulada en forma de ungüento, crema o gel, y se podrían emplear agentes penetrantes o detergentes apropiados para facilitar la permeación, tales como dimetilsulfóxido, dimetilacetamida y dimetilformamida.

Para administración transmucosa se pueden emplear composiciones para pulverización nasal y supositorios rectales o vaginales. El compuesto activo se puede incorporar a cualquiera de las bases para supositorios conocidas mediante métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de dichas bases incluyen manteca de cacao,

polietilenglicoles (productos Carbowax), monoestearato de polietilensorbitán, y mezclas de estos con otros materiales compatibles para modificar el punto de fusión o la velocidad de disolución.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular para que sustancialmente liberen el fármaco activo inmediatamente después de la administración o en cualquier momento o periodo de tiempo predeterminados después de la administración.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden comprender uno o más inhibidores del receptor tirosina cinasa TYRO3 asociados con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes y/o vehículos se escogen de acuerdo con la forma de administración, como se describió anteriormente. También se pueden asociar otros compuestos activos con inhibidores del receptor tirosina cinasa TYRO3, en particular fármacos antitumorales tales como tamoxifeno, inhibidores de aromatasas, trastuzumab, compuestos análogos a GnRH, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, mitomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, daunorrubicina, docetaxel, ciclofosfamida, epirubicina, fluorouracilo, metotrexato, mitoxantrona, vinblastina, vincristina, vinorelbina, bleomicina, fosfato de estramustina y fosfato de etopósido. En una realización particular, se pueden asociar inhibidores del receptor tirosina cinasa TYRO3 con otras moléculas empleadas para el tratamiento del cáncer de vejiga (por ejemplo, cisplatino, adriamicina, mitomicina C, gemcitabina, paclitaxel o docetaxel).

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende uno o más inhibidores del receptor tirosina cinasa TYRO3 seleccionados del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3, una molécula de RNAi específica para TYRO3, particularmente un siRNA, un receptor negativo dominante que presenta un dominio cinasa muerto, y un receptor TYRO3 soluble.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende uno o más inhibidores del receptor tirosina cinasa TYRO3 seleccionados del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3, una molécula de RNAi específica para TYRO3, particularmente un siRNA, un receptor negativo dominante que presenta un dominio cinasa muerto, un anticuerpo dirigido contra Gas6, y un receptor TYRO3 soluble.

La cantidad de inhibidor de receptor tirosina cinasa TYRO3 que se va a administrar ha de ser determinada mediante un procedimiento estándar bien conocido por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. Para determinar la dosificación apropiada se han de tener en cuenta datos fisiológicos del paciente (por ejemplo, la edad, el tamaño y el peso), las vías de administración y la enfermedad que se va a tratar.

El inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 se puede administrar en una sola dosis o en múltiples dosis. Si el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es una molécula pequeña que inhibe la actividad tirosina cinasa, cada dosis unitaria puede contener, por ejemplo, de 200 a 1000 mg/kg de peso corporal, particularmente de 500 a 800 mg/kg de peso corporal. Si el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3, cada dosis unitaria puede contener, por ejemplo, de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, particularmente de 4 a 10 mg/kg de peso corporal. Si el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es una molécula de RNAi específica para TYRO3, cada dosis unitaria puede contener, por ejemplo, de 2 a 50 mg/kg de peso corporal, particularmente de 5 a 20 mg/kg de peso corporal. Si el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 es un receptor negativo dominante que presenta un dominio cinasa muerto o es un receptor TYRO3 soluble, cada dosis unitaria puede contener, por ejemplo, de 5 a 100 mg/kg de peso corporal, particularmente de 15 a 70 mg/kg de peso corporal. Si el inhibidor es un anticuerpo dirigido contra Gas6 o la proteína S, cada dosis unitaria puede contener, por ejemplo, de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, particularmente de 4 a 10 mg/kg de peso corporal.

El inhibidor de TYRO3 se puede utilizar en combinación con otros ingredientes activos, en particular con otros inhibidores de TYRO3 o con otros tratamientos para el cáncer, tales como tamoxifeno, inhibidores de aromatasas, trastuzumab, compuestos análogos a GnRH, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, mitomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, daunorrubicina, docetaxel, ciclofosfamida, epirubicina, fluorouracilo, metotrexato, mitoxantrona, vinblastina, vincristina, vinorelbina, bleomicina, fosfato de estramustina y fosfato de etopósido. En particular, el inhibidor de TYRO3 se puede emplear en combinación con otros tratamientos para el cáncer de vejiga, tales como el tratamiento con BCG (por ejemplo, documento WO 05/077411) y la administración de fármacos anticancerosos, tales como, por ejemplo, cisplatino, adriamicina, mitomicina C, gemcitabina, paclitaxel y docetaxel. En este caso, los inhibidores de TYRO3 y las demás moléculas se pueden administrar simultánea o consecutivamente.

La presente invención también se refiere al uso de un inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3.

La presente invención proporciona un método para explorar o identificar una molécula adecuada para tratar un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3. El método es un método *in vitro*.

En una realización particular, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es seleccionado del grupo que consiste en tumor de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de

Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia de células pilosas, cáncer metastásico de próstata, melanoma y cáncer colorrectal. En una realización preferida, el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un tumor de vejiga.

5 Este método se basa en el análisis de la capacidad de una molécula para unirse al receptor TYRO3, competir con o por un ligando del receptor TYRO3, disminuir la expresión del gen TYRO3 o disminuir la fosforilación de los sustratos de TYRO3 o la autofosforilación de TYRO3.

10 El método para explorar o identificar una molécula adecuada para tratar un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 comprende las operaciones de (i) poner moléculas candidatas en contacto con células que expresan el receptor TYRO3, y (ii) seleccionar las moléculas que tienen la capacidad para unirse al receptor TYRO3 y/o competir con y/o por un ligando del receptor TYRO3 y/o disminuir la expresión del gen TYRO3 y/o disminuir la fosforilación de los sustratos de TYRO3 o la autofosforilación de TYRO3. Las células empleadas para esta exploración pueden ser células que expresan un nivel elevado de TYRO3 endógeno, tales como la mayoría de las líneas celulares de vejiga, en particular las líneas celulares J82 y RT112, o células genéticamente modificadas que sobreexpresan TYRO3 permitiendo una detección optimizada de la actividad tirosina cinasa. El método puede comprender una operación (i') de determinación de la capacidad de las moléculas candidatas para unirse al receptor TYRO3 y/o competir con y/o por un ligando del receptor TYRO3 y/o disminuir la fosforilación de los sustratos de TYRO3 o la autofosforilación de TYRO3.

La unión de una molécula al receptor TYRO3 puede ser medida mediante técnicas bien conocidas, tales como resonancia de plasmones superficiales, calorimetría y tecnología Biacore.

20 La capacidad de una molécula para competir con o por un ligando del receptor TYRO3 puede ser evaluada, por ejemplo, mediante experimentos de competición con un ligando marcado, en particular un ligando radiomarcado, tecnología Biacore u observaciones espectroscópicas.

La expresión del gen TYRO3 puede ser evaluada con diferentes técnicas bien conocidas, tales como RT-PCR cuantitativa, transferencia Northern, ensayo ELISA y transferencia Western.

25 El nivel de fosforilación de TYRO3 puede ser evaluado por transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina o anti fosfo-TYRO3, un ensayo FlashPlate radiactivo, un ensayo de transferencia de energía de resonancia con fluorescencia (FRET; del inglés, fluorescent resonance energy transfer) o un inmunoensayo de fluorescencia de lantánidos con disociación potenciada (DELFI; del inglés, dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunassay).

30 Este método, como se describió anteriormente, puede comprender además una operación subsiguiente que consiste en administrar la molécula previamente seleccionada mediante el método *in vitro* de la invención, como se describió anteriormente, a un modelo animal no humano con cáncer en que se sobreexpresa TYRO3, en particular a un modelo animal no humano con tumor de vejiga, y analizar el efecto sobre la progresión del tumor. Se puede evaluar la eficacia de la molécula, por ejemplo, analizando el tiempo de vida de los animales, la aparición de metástasis, la progresión del tumor, y la aparición de invasión muscular del cáncer. Todas estas características han de ser comparadas con las de testigos que consisten en modelos animales no humanos con cáncer en que se sobreexpresa TYRO3, tal como un modelo animal no humano con tumor de vejiga, que no han recibido tratamiento. El modelo animal no humano puede ser ratones desnudos con tumor injertado. En una realización particular, el tumor injertado es un tumor de vejiga.

40 Los ejemplos siguientes se presentan con fines de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Sobreexpresión de TYRO3 y GAS6 en tumores de vejiga

45 Se analizaron los niveles de RNA en 80 carcinomas de vejiga y 5 urotelios de vejiga normales usando micromatrices de DNA Affymetrix U95A. Se empleó el software SAM (<http://www.stat.stanford.edu/~tibs/SAM>) para identificar genes que presentaban expresión diferencial entre muestras tumorales y normales. El software SAM con los parámetros "índice de descubrimientos falsos de 10%" y "factor de cambio SAM de al menos 2" permitió identificar 823 conjuntos de sondas significativamente más intensamente expresados en tumores en comparación con el urotelio normal, y 477 conjuntos de sondas menos intensamente expresados en tumores.

50 Entre estos genes suprarregulados el enfoque se realizó sobre TYRO-3 cinasa, y los resultados obtenidos con SAM fueron confirmados utilizando una prueba de ANOVA (Figura 1B). Luego se comparó el nivel de RNA de TYRO3 (datos de chips de DNA Affymetrix MAS 5) en cada muestra tumoral con la distribución de niveles de RNA de TYRO3 en muestras normales, y la diferencia fue considerada significativa si excedía de tres desviaciones estándares (unidad tipificada $z > 3$, $p < 0,0013$). TYRO3 estaba significativamente sobreexpresado en 57/80 tumores

(71%). Esta sobreexpresión era independiente de la fase y el grado tumorales (Figura 1A). Estos resultados obtenidos a partir de datos de Affymetrix se confirmaron mediante un análisis por Q-RT-PCR (datos no mostrados).

5 Resulta interesante que GAS6, el único ligando conocido de TYRO3, también estaba significativamente sobreexpresado en tumores invasivos en comparación con tumores normales o superficiales (análisis SAM de genes diferencialmente expresados entre muestras normales e invasivas o entre tumores superficiales e invasivos, confirmado mediante una prueba de ANOVA) (Figura 2A).

10 No se observó correlación alguna entre nivel de expresión de mRNA y número de copias de DNA en el locus TYRO3 ni el locus GAS6, lo que sugiere que las sobreexpresiones de TYRO3 y GAS6 no se debían a una multiplicación de DNA. Una hibridación *in situ* mostró que TYRO3 era expresado por células epiteliales mientras que GAS6 es expresado por células tanto epiteliales como estromales, lo que sugiere una posible activación autocrina o paracrina de TYRO3 por GAS6 en tumores invasivos y un refuerzo del papel de TYRO3 en esos carcinomas (datos no mostrados). No se halló mutación alguna de TYRO3 en un subconjunto de 15 muestras de tumor de vejiga que expresaban diversos niveles de mRNA de TYRO3.

Ejemplo 2: Efecto de la inhibición de la actividad de TYRO3 en células de tumor de vejiga

15 Para explorar el papel de TYRO3 en el carcinoma de vejiga, el primer paso fue identificar líneas celulares procedentes de cáncer de vejiga que simularan tumores superficiales que sólo expresan TYRO3 y tumores invasivos que expresan tanto TYRO3 como GAS6. Por lo tanto, se investigaron los niveles de expresión de mRNA de TYRO3 y GAS6 en 8 líneas celulares procedentes de cáncer de vejiga [líneas celulares T24, RT4, KK47, TCCSUP, EJ138, J82 y RT112 (ATCC) y línea celular MGH-U3 (Lin et al., 1985)] y en una línea celular procedente de urotelio normal, NHU (ATCC), mediante Q-RT-PCR (Figura 3). Todas las líneas celulares tumorales estudiadas expresaban TYRO3 más intensamente que la línea celular proliferativa normal, lo que sugiere que la expresión de TYRO3 dependía del cáncer y no estaba vinculada a la proliferación celular.

25 Con objeto de investigar el papel de TYRO3 en el crecimiento celular y las propiedades tumorigénicas, se bloqueó la expresión de TYRO3 usando la tecnología de interferencia por RNA o se inhibió la actividad de TYRO3 utilizando un anticuerpo bloqueante dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3 o un receptor soluble consistente en el dominio extracelular recombinante de TYRO3 producido en bacterias. Se emplearon dos líneas celulares que expresaban TYRO3 (MGH-U3 y KK47), dos líneas celulares que expresaban tanto TYRO3 como GAS6 (J82 y RT112) y una línea celular testigo procedente de cáncer de mama que presentaba un bajísimo nivel de expresión de TYRO3 (MCF-7). Se mostró por transferencia Western, utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina después de la inmunoprecipitación de TYRO3, que en cada tipo de línea celular (expresase GAS6 o no) estaba activado TYRO3 (datos no mostrados).

30 La transfección de células MGH-U3, KK47, J82 y RT112 con siRNAs de TYRO3 disminuyó acusadamente los niveles de mRNA y proteína TYRO3 (inhibición de 80-90%) (en la Figura 4 se presentan los resultados para las células MGH-U3). Esta reducción de actividad de TYRO3 produjo menos células MGH-U3, KK47, J82 y RT112 viables que el siRNA testigo (Figura 5) mientras que no tuvo efecto alguno sobre las células MCF7, lo que sugiere que el efecto observado después de la transfección con el siRNA específico se debía más bien a un silenciamiento génico específico que a un efecto secundario. También se obtuvo el mismo efecto sobre el crecimiento celular al bloquear TYRO3 usando unos anticuerpos policlonales dirigidos contra su dominio extracelular (Figura 6) o un receptor soluble recombinante que consistía en el dominio extracelular entero de TYRO3 (aa 1 a 421) (Figura 7).

40 Este número disminuido de células viables podría ser atribuido a un índice apoptótico aumentado (Figura 8) con un cambio significativo aunque pequeño en la progresión del ciclo celular (Figura 9). La reducción de actividad de TYRO3 también produjo menos colonias MGH-U3, KK47, RT112 y J82 viables en ensayos en agar blando, lo que demostraba que TYRO3 regulaba la supervivencia celular de células cancerosas clonogénicas (Figura 10).

Ejemplo 3: Estudios *in vivo* sobre el papel de TYRO3 en el crecimiento de células de cáncer de vejiga

45 De este modo, nuestros resultados demostraron claramente que TYRO3 regula la supervivencia/proliferación de células de cáncer de vejiga *in vitro*. Se estudió el papel de este gen en el crecimiento de células de cáncer de vejiga *in vivo*. Se implantaron subcutáneamente células J82 y MGH-U3 en ratones desnudos atímicos. Una vez que se hubieron establecido los tumores, se seleccionaron aleatoriamente ratones para tratamiento con siRNA testigo o específico de TYRO3. En cuanto a los xenoinjertos de J82, dos semanas después del comienzo del tratamiento sólo se observaron tres tumores de 12 (Figuras 11A y 11B). En cuanto a los xenoinjertos de MGH-U3, después de 21 días de tratamiento el volumen tumoral era un 70% menor en los ratones tratados con siRNA de TYRO3 que en los ratones tratados con siRNA testigo (prueba de suma de rangos de Wilcoxon, $p < 0,001$) (Figuras 12A y 12B).

55 Esta inhibición del crecimiento tumoral estaba asociada con una disminución significativa de los niveles de mRNA de TYRO3 (prueba t de Student, $p < 0,001$), medidos en un momento (3 días después de la última inyección de siRNA) en que esta disminución debería ser la mínima (Figura 13). No se observó diferencia histológica alguna entre los

tumores tratados y los testigo (datos no mostrados), pero un análisis TUNEL demostró que la inhibición del crecimiento tumoral se debía a una apoptosis aumentada en los tumores tratados (datos no mostrados).

También se examinó *in vivo* la capacidad de un receptor soluble consistente en el dominio extracelular recombinante de TYRO3, producido en bacterias, para inducir una inhibición del crecimiento de células de cáncer de vejiga. Se implantaron subcutáneamente células MGH-U3 en ratones desnudos atímicos. Una vez que se hubieron establecido los tumores, se seleccionaron aleatoriamente ratones para tratamiento con PBS o receptor TYRO3 soluble. Después de 18 días de tratamiento, el volumen tumoral era un 70% menor en los ratones tratados con receptor TYRO3 soluble que en los ratones tratados con PBS (prueba de suma de rangos de Wilcoxon, $p < 0,001$) (Figuras 14A y 14B). Esta inhibición del crecimiento tumoral se debía a una apoptosis aumentada en los tumores tratados (Figura 15).

Considerados en conjunto, nuestros resultados permitieron identificar a TYRO3 como un gen principal implicado en el carcinoma de vejiga, que está suprarregulado en la mayoría de los casos (70-75% de los tumores) independientemente de la fase y/o el grado de los tumores y que es responsable de la supervivencia de células tumorales. Además, estos experimentos demuestran que los compuestos que inducen inhibición o supresión de TYRO3 provocan una apoptosis potenciada de células de tumor de vejiga y, en consecuencia, pueden ser empleados para tratar el tumor de vejiga.

Ejemplo 4: Sobreexpresión de TYRO3 en varios tipos de tumores

Puesto que se identificó una sobreexpresión de TYRO3 en tumores de vejiga y se demostró el papel antiapoptótico de TYRO3 en este contexto, los inventores se preguntaron si TYRO3 podría estar implicado en otros cánceres y, en consecuencia, podría ser empleado como una diana terapéutica para tratar esos tumores. Utilizando datos públicamente disponibles compilados en la página web de Oncomine, se identificaron 7 tipos de cánceres en que TYRO3 estaba suprarregulado en tumores en comparación con muestras normales: carcinoma de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático y leucemia de células pilosas (Figuras 16A y 16B). Los inventores también identificaron otro cáncer, de próstata, en que la expresión de TYRO3 aumentaba durante la progresión tumoral, es decir, en cánceres de próstata metastásicos, en comparación con el carcinoma de próstata (datos no mostrados). Utilizando la base de datos GeneSapiens para obtener gráficos de la expresión de TYRO3 en un amplio espectro de tejidos normales (Figura 17) y tumorales (Figura 18), también se identificó la sobreexpresión de TYRO3 en otros dos tipos de cáncer: melanoma y cáncer colorrectal.

Referencias

Abbas-Terki, T., et al. (2002), *Hum. Gene Ther.* **13** (18): 2197-201.

An, D. S., et al. (2003), *Hum. Gene Ther.* **14** (12): 1207-12.

Bernstein, E., et al. (2001), *Nature* **409** (6818): 363-6.

Bridge, A. J., et al. (2003), *Nat. Genet.* **34** (3): 263-4.

Elbashir, S. M., et al. (2001), *Embo J.* **20** (23): 6877-88.

Elbashir, S. M., et al. (2001), *Genes Dev.* **15** (2): 188-200.

Fanning y Symonds (2006), *RNA Towards Medicine (Handbook of Experimental Pharmacology)*, editorial Springer, páginas 289-303.

Fisher et al., 2005, *Biochem. J.* **3**: 727-735.

Gould et al., 2005, *J. Thromb. Haemost.* **4**: 733-741.

Harlow, E. y Lane, D. (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, editorial Cold Spring Harbor Laboratory.

Karaman M., et al. (2008), *Nat. Biotechnol.* **26** (1): 127-32.

Lai, C., et al., *Oncogene* (1994) **9**, 2567-2578.

Lan, Z., et al., *Blood* (2000) **2**, 633-8.

Lin, C. W., et al. (1985), *Cancer Res.* **45** (10): 5070-5079.

Scherr, M., et al. (2003), *Cell Cycle* **2** (3): 251-7.

- Stenhoff et al., 2004, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**: 871-878.
- Sun W. S., et al., *Mol. Hum. Reprod.* (2002) **8**, 552-558.
- Sun W. S., et al., *Mol. Hum. Reprod.* (2003a) **11**, 701-707.
- Sun W. S., et al., *Ann. Oncol.* (2003b) **6**, 898-906.
- 5 Taylor I. C., et al. (1995), *J. Biol. Chem.* **270**, 6872-6880.
- Xia, H., et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* **20** (10): 1006-10.
- Wimmel A., et al., *Cancer* (1999) **1**, 43-49.
- Zamore, P. D., et al. (2000), *Cell* **101** (1): 25-33.
- Rhodes et al. (2004), *Neoplasia* **6** (1): 1-6.
- 10 Kilpinen et al., (2008), *Genome Biology* **9** (9): R139.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> INSTITUT CURIE
 CNRS
 AP-HP
 Universite Paris XII

<120> Receptor tirosina cinasa TYRO3 como una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer

10 <130> B763PC

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia Artificial

25 <400> 1
 ggugugccau uuuucacagt t 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia Artificial

35 <400> 2
 ggcaagauuc uucucguugt t 21

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 para uso en el tratamiento de un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3, seleccionado del grupo que consiste en tumor de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia de células pilosas, cáncer metastásico de próstata, melanoma y cáncer colorrectal, en donde el inhibidor es seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de TYRO3, una molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente en la expresión de TYRO3, un receptor negativo dominante TYRO3 que presenta un dominio cinasa muerto, y un señuelo soluble de TYRO3, siendo dicho señuelo soluble de TYRO3 un receptor TYRO3 recombinante constituido por, al menos, un dominio de tipo Ig o de fibronectina III del dominio extracelular del receptor.
2. El inhibidor para uso según la Reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente en la expresión de TYRO3 es un RNAi, un ácido nucleico antisentido o una ribozima.
3. El inhibidor para uso según la Reivindicación 2, en donde el RNAi es un siRNA, en particular un siRNA que comprende una secuencia de ID. SEC. nº 1.
4. El inhibidor para uso según la Reivindicación 1, en donde el inhibidor es un receptor TYRO3 recombinante constituido por, al menos, un dominio de tipo Ig o de fibronectina III del dominio extracelular del receptor.
5. El inhibidor para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde el inhibidor del receptor tirosina cinasa TYRO3 se utiliza en combinación con otro ingrediente activo, en particular un fármaco antitumoral.
6. El inhibidor para uso según la Reivindicación 5, en donde el fármaco antitumoral es seleccionado del grupo que consiste en tamoxifeno, inhibidores de aromatasas, trastuzumab, compuestos análogos a GnRH, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, mitomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, daunorubicina, docetaxel, ciclofosfamida, epirrubicina, fluorouracilo, metotrexato, mitoxantrona, vinblastina, vincristina, vinorelbina, bleomicina, fosfato de estramustina y fosfato de etoposido.
7. Método *in vitro* para explorar o identificar una molécula adecuada para tratar un cáncer en que se sobreexpresa TYRO3, en donde el método comprende las operaciones de (i) poner moléculas candidatas en contacto con células que expresan el receptor TYRO3, y (ii) seleccionar las moléculas que tienen la capacidad para unirse al receptor TYRO3 y/o competir con y/o por un ligando del receptor TYRO3 y/o disminuir la expresión del gen TYRO3 y/o disminuir la fosforilación de los sustratos de TYRO3 o la autofosforilación de TYRO3.
8. El método según la Reivindicación 7, que comprende además la operación de administrar la molécula seleccionada mediante el método de la Reivindicación 7 a un modelo animal no humano con cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 y analizar el efecto sobre la progresión de la enfermedad.
9. El método según la Reivindicación 8, en donde el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un tumor de vejiga y el modelo animal no humano con cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es un modelo animal no humano con tumor de vejiga.
10. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 9, en donde el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es seleccionado del grupo que consiste en tumor de vejiga, linfoma difuso de células B grandes, carcinoma adenoide quístico de glándula salival, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia de células pilosas, cáncer metastásico de próstata, melanoma y cáncer colorrectal.
11. El inhibidor para uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 o el método de la Reivindicación 10, en donde el cáncer en que se sobreexpresa TYRO3 es tumor de vejiga.
12. El inhibidor para uso de la Reivindicación 11, para uso en combinación con otro tratamiento para el tumor de vejiga.

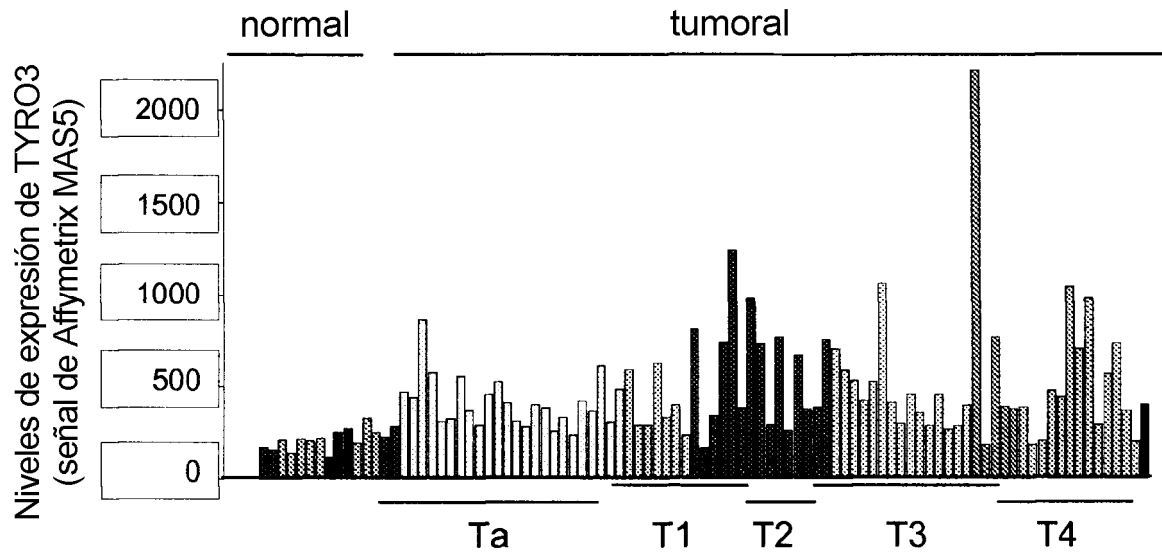


Figura 1A

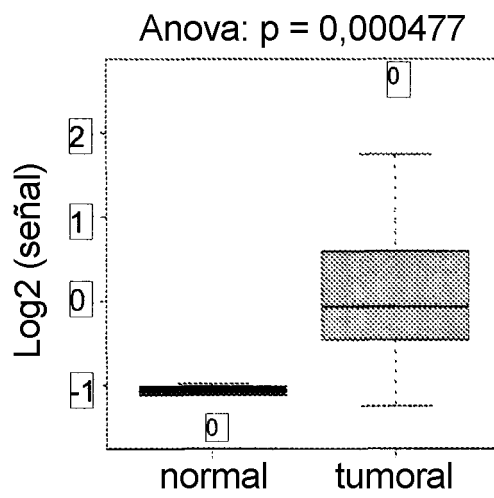


Figura 1B

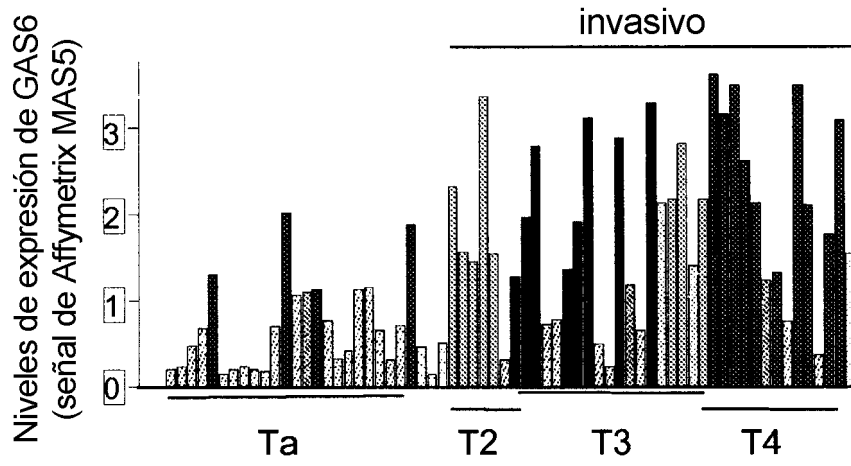


Figura 2A

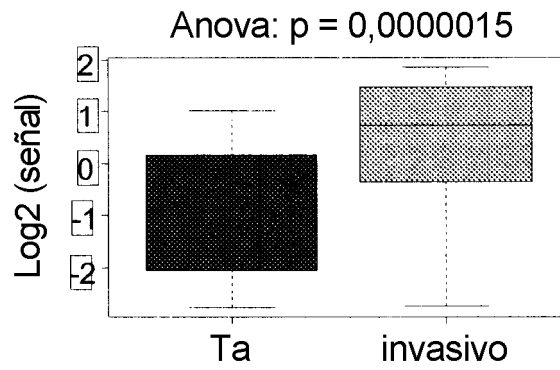


Figura 2B

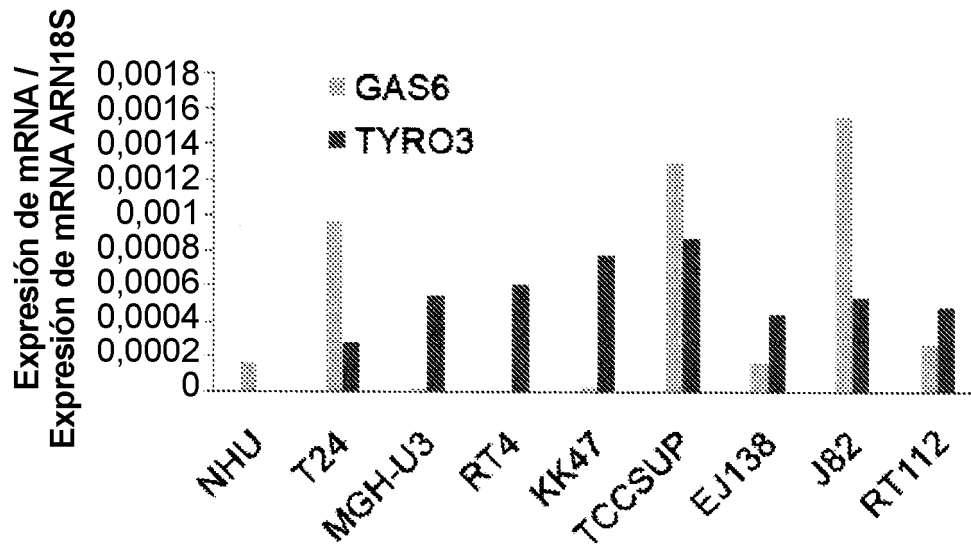


Figura 3

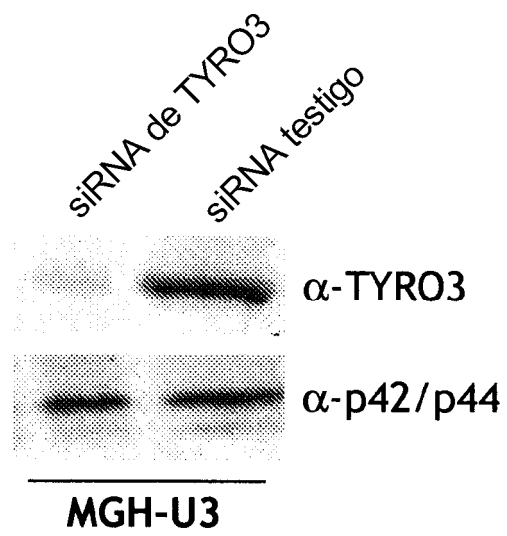


Figura 4

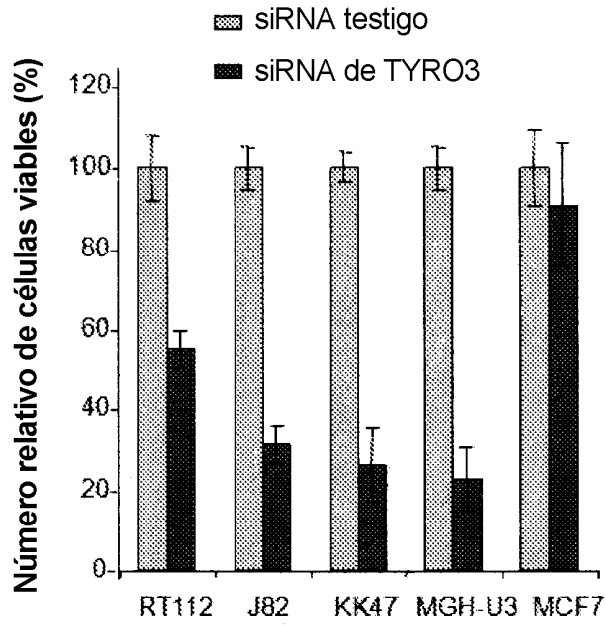


Figura 5

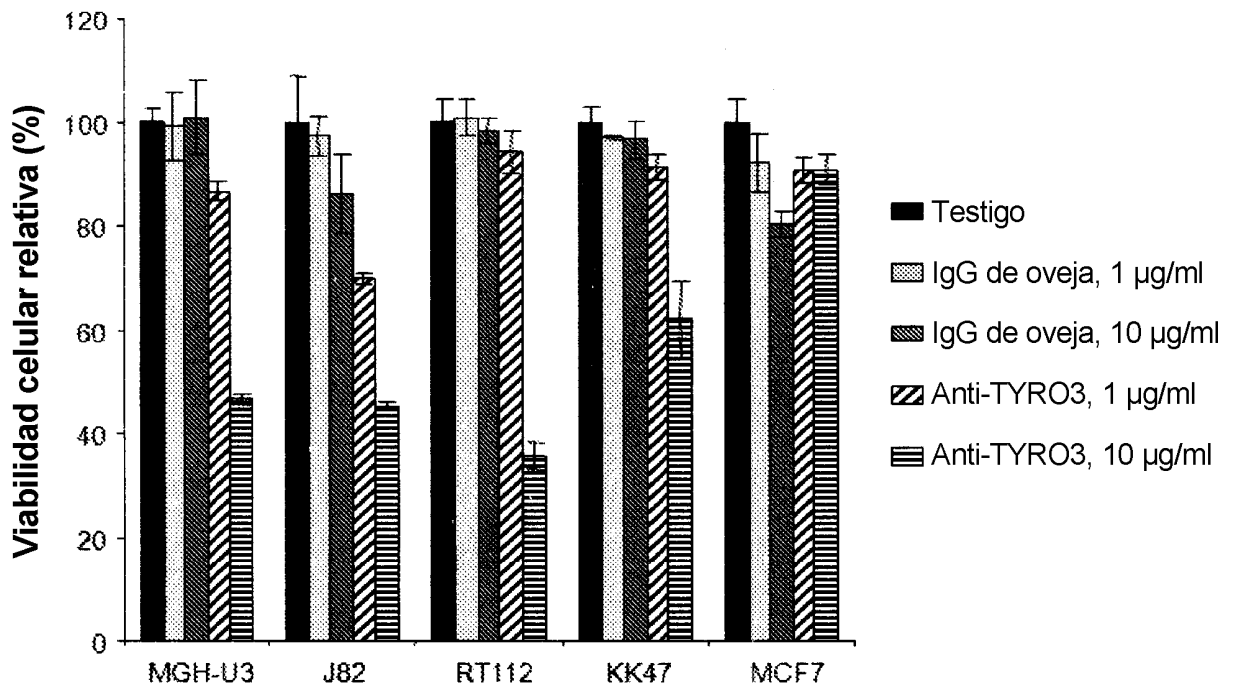


Figura 6

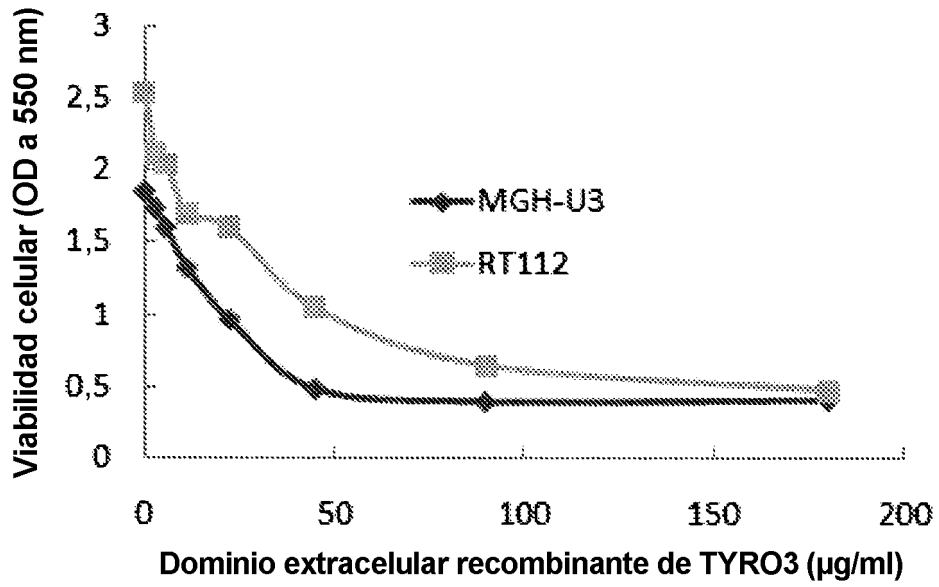


Figura 7

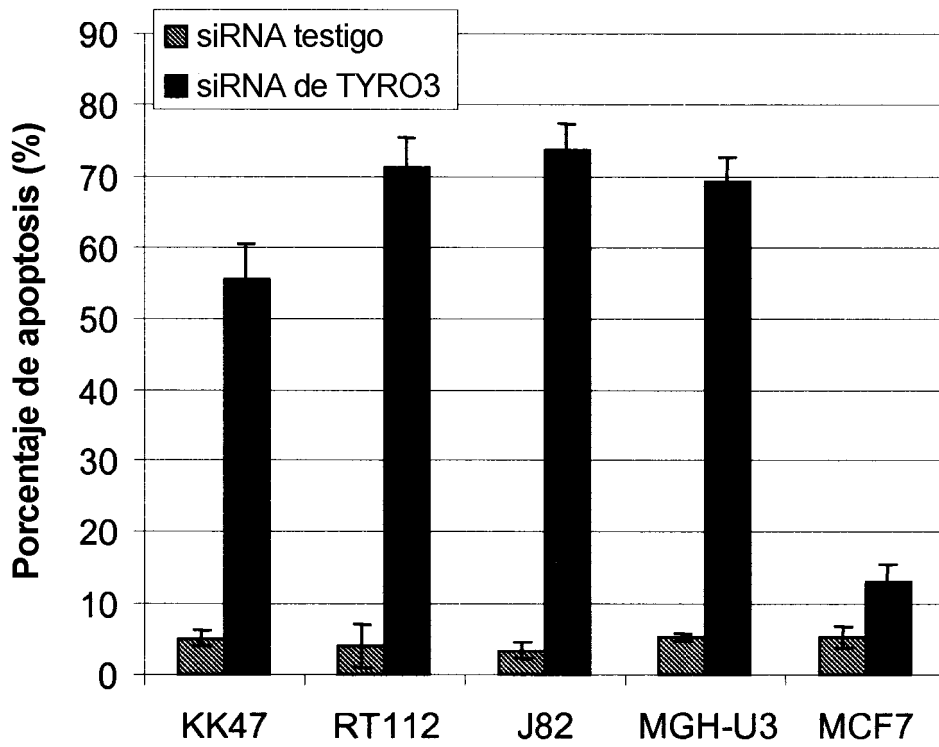


Figura 8

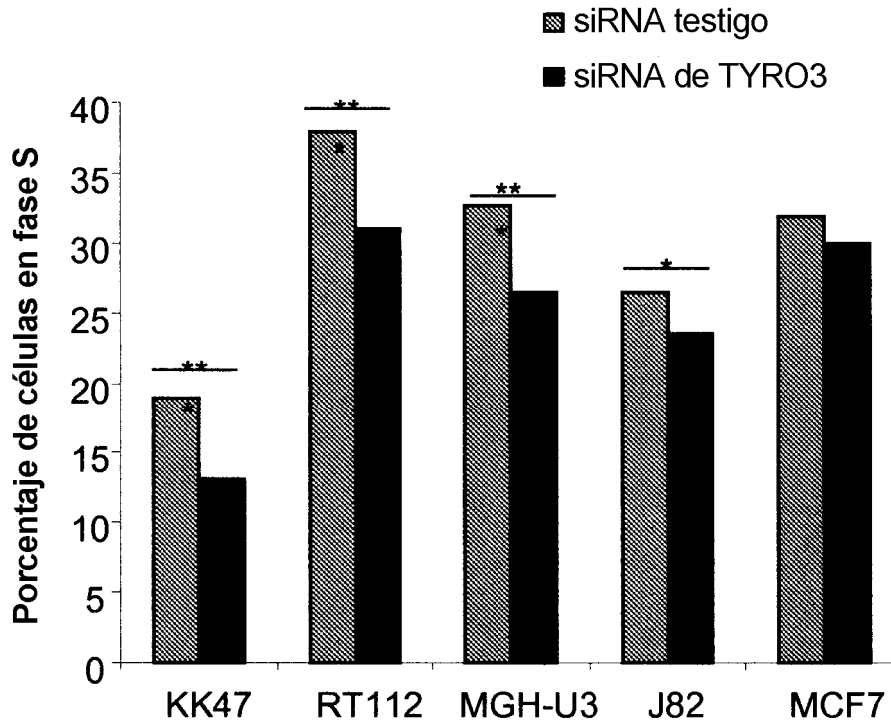


Figura 9

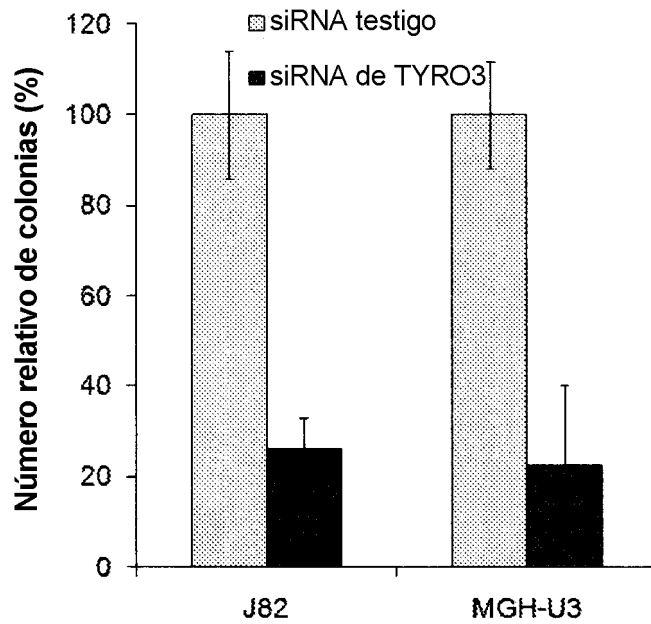


Figura 10

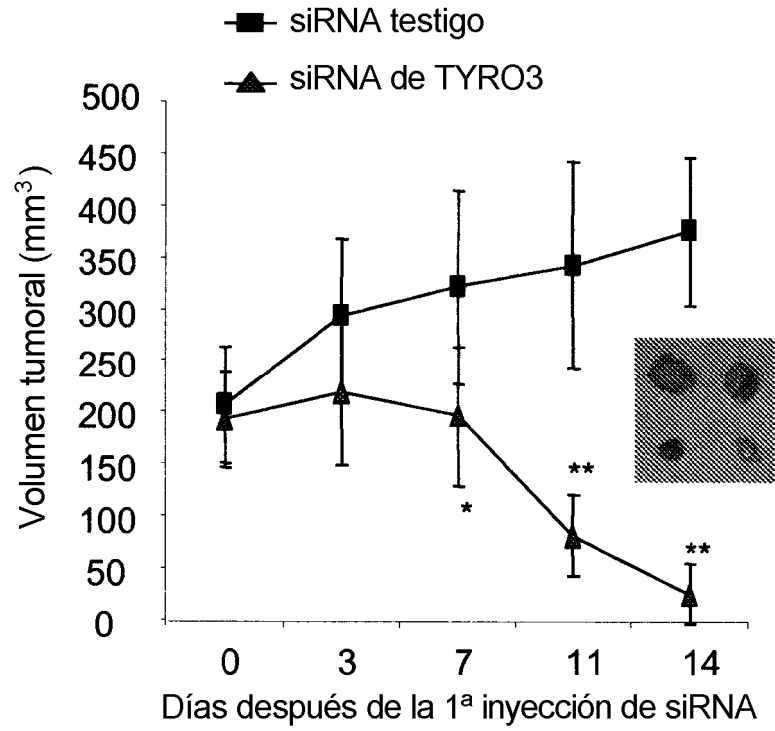


Figura 11A

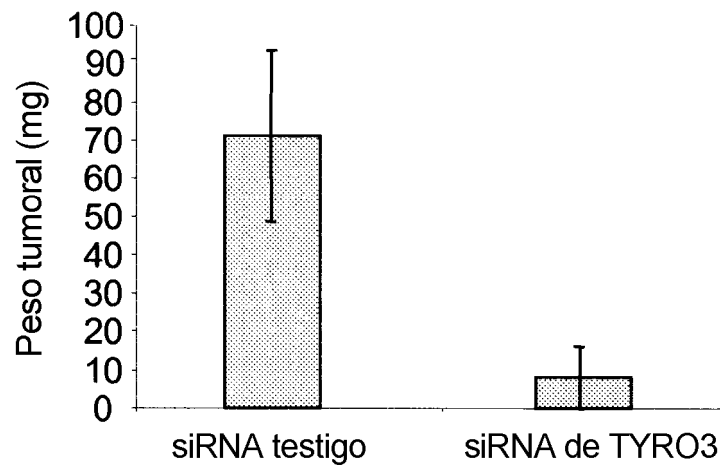


Figura 11B

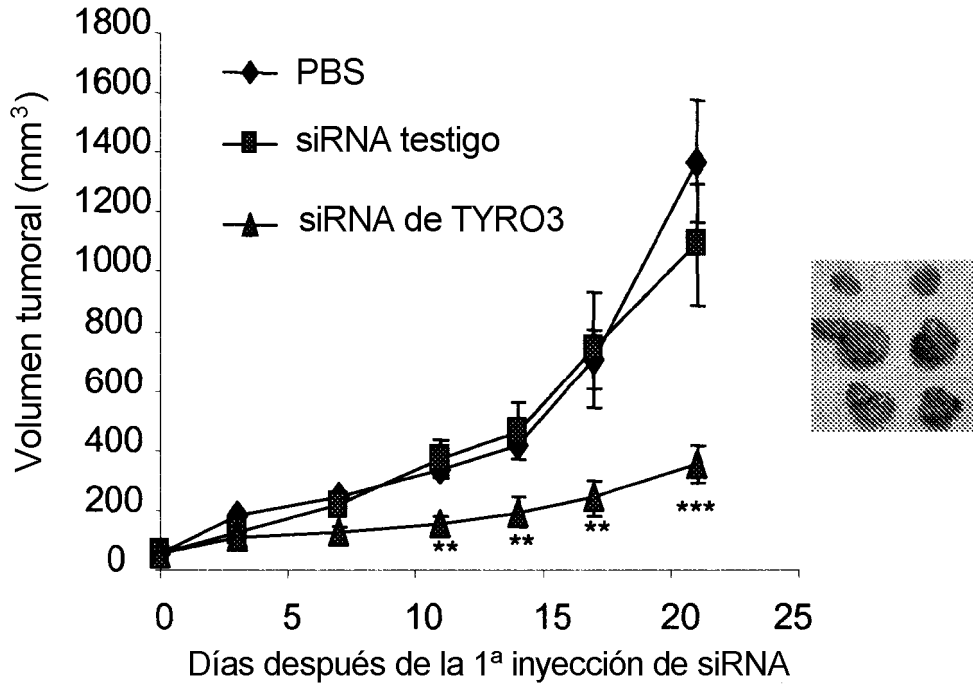


Figura 12A

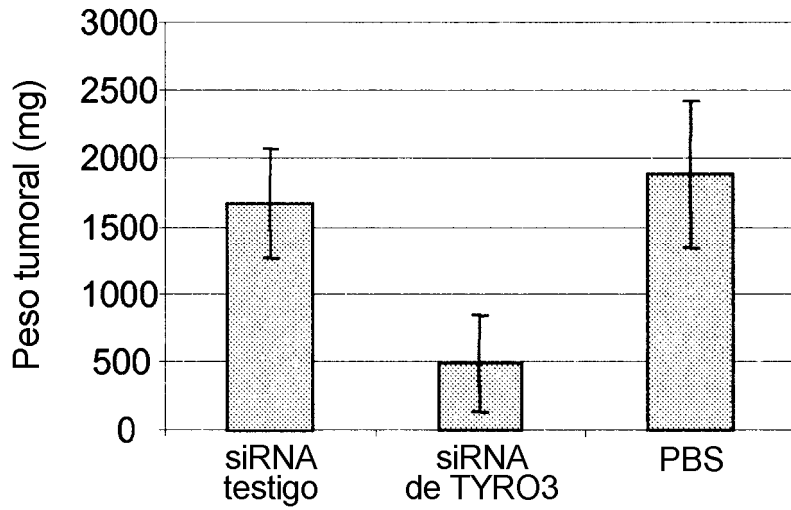


Figura 12B

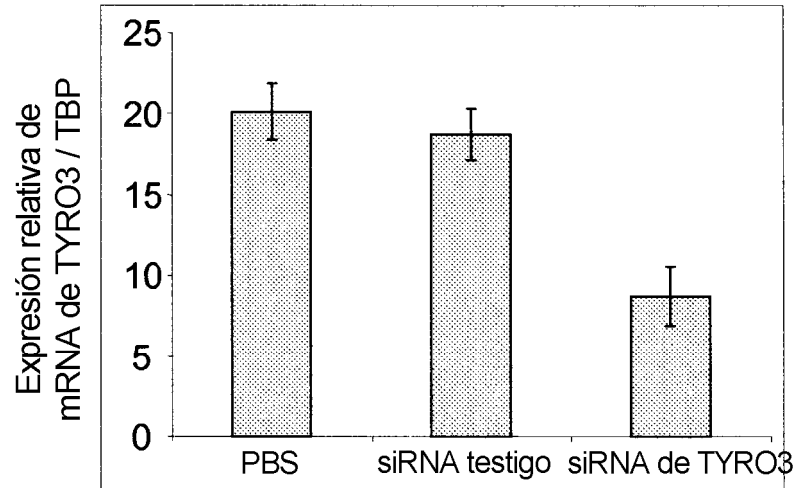


Figura 13

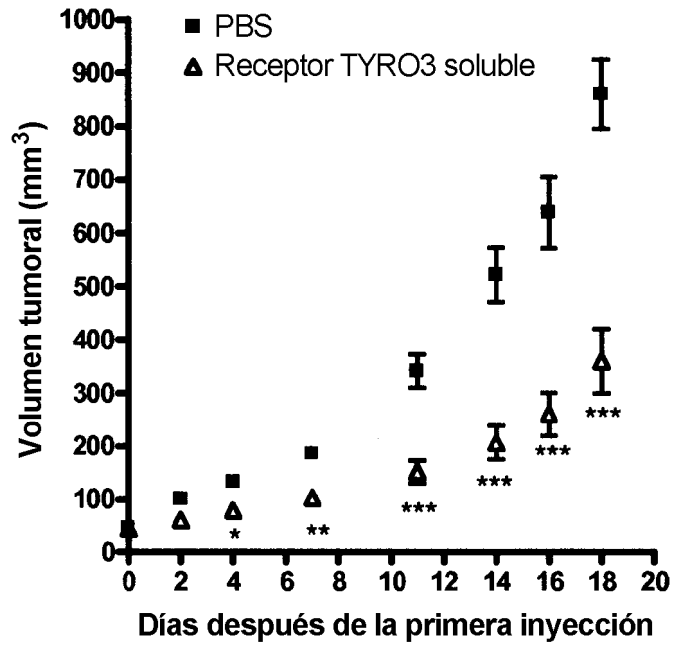


Figura 14A

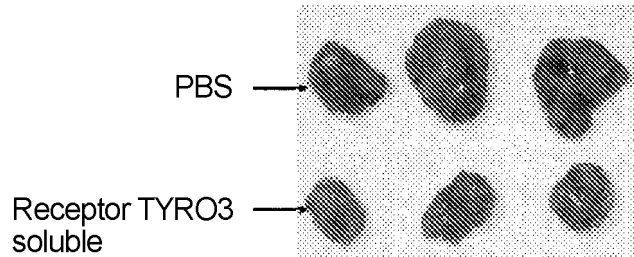


Figura 14B

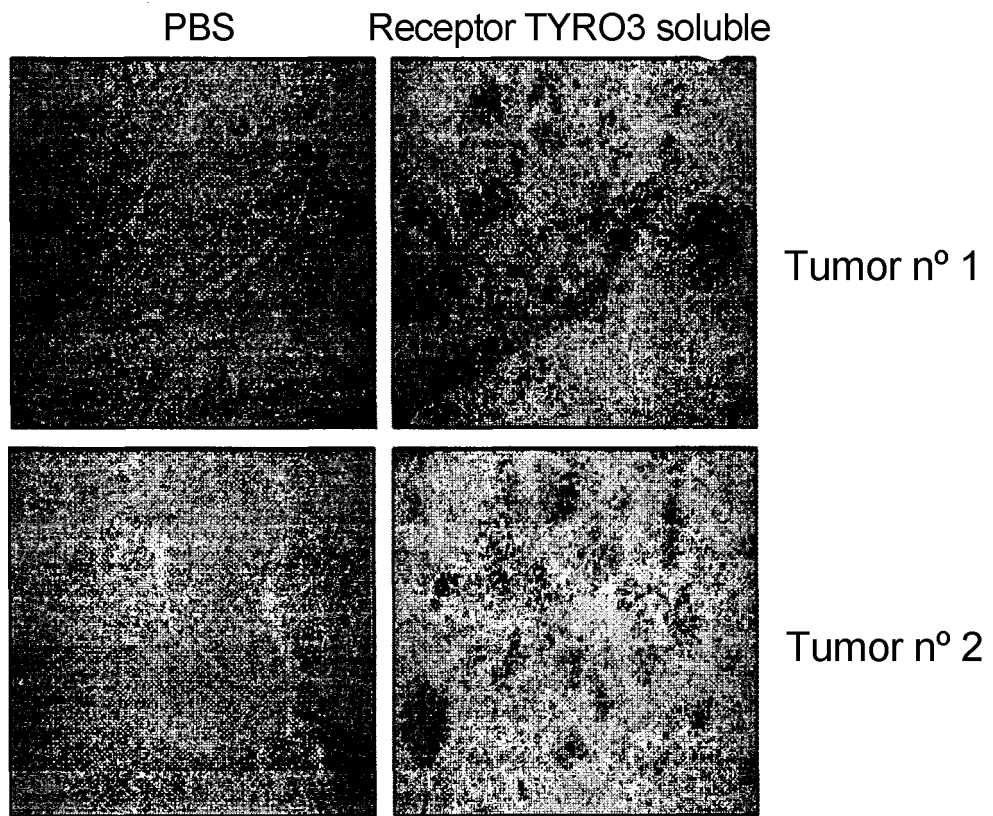


Figura 15

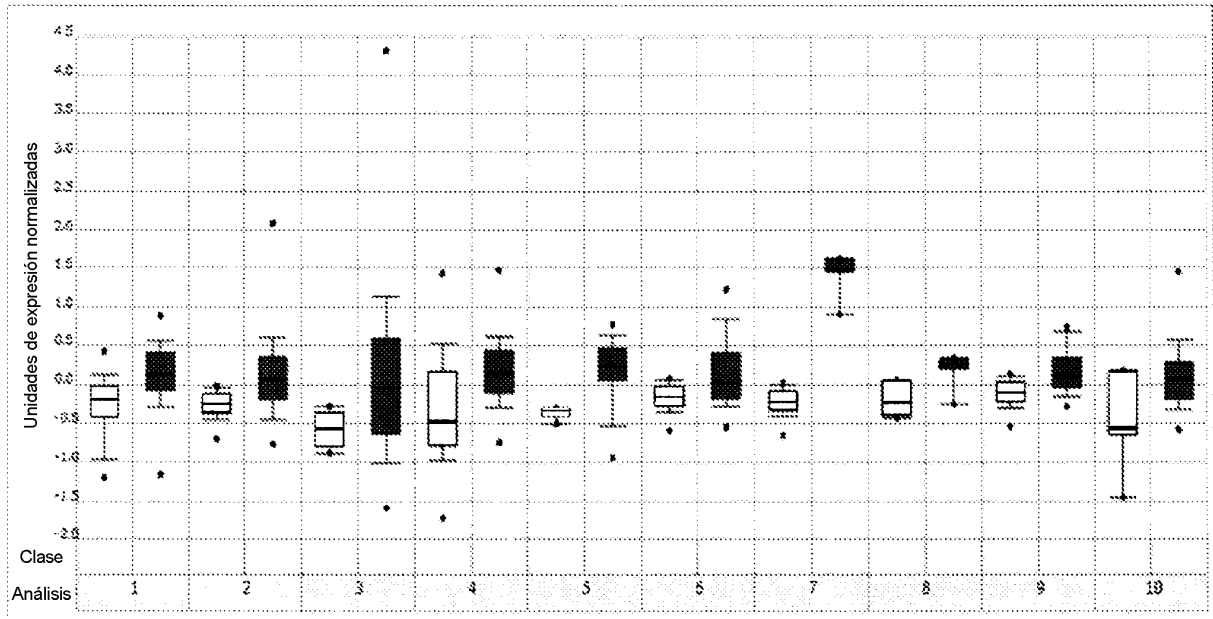


Figura 16A

Análisis	Estudio	Tejido	Clase 1	Clase 2	Valor p en la prueba t
1	Sanchez-Carbayo et al., J. Clin. Oncol. (2006) 5: 778-789	Vejiga	Vejiga normal (48)	Carcinoma de vejiga (109)	3,70E-09
2	Basso et al., Nat. Genet. (2005) 4: 382-390	Linfoma	Células B normales (25)	Linfoma difuso de células B grandes (69)	1,80E-07
3	Rosenwald et al., N. Engl. J. Med. (2002) 25: 1937-1947	Linfoma	Células B CD19+ sanguíneas normales (6), células B de centro germinal normales (4)	Linfoma difuso de células B grandes (274)	3,30E-06
4	Alizadeh et al., Nature (2000) 6769: 503-511	Linfoma	Linfoide benigno (31)	Linfoma difuso de células B grandes (68)	3,60E-04
5	Frierson et al., Am. J. Pathol. (2002) 4: 1315-1323	Glándula salival	Glándula salival normal (6)	Carcinoma adenoide quístico de glándula salival (16)	4,90E-04
6	Basso et al., Nat. Genet. (2005) 4: 382-390	Linfoma	Células B normales (25)	Linfoma de Burkitt (31)	0,001
7	Basso et al., Nat. Genet. (2005) 4: 382-390	Linfoma	Células B normales (25)	Mieloma múltiple (4)	0,002
8	Buchholz et al., Oncogene (2005) 44: 6626-6636	Páncreas	Conductos pancreáticos normales (6)	Adenocarcinoma ductal pancreático (8)	0,003
9	Basso et al., Nat. Genet. (2005) 4: 382-390	Linfoma	Células B normales (25)	Leucemia de células pilosas (16)	0,003
10	Rosenwald et al., N. Engl. J. Med. (2002) 25: 1937-1947	Linfoma	Células B normales (25)	Linfoma difuso de células B grandes (38)	0,009

Figura 16B

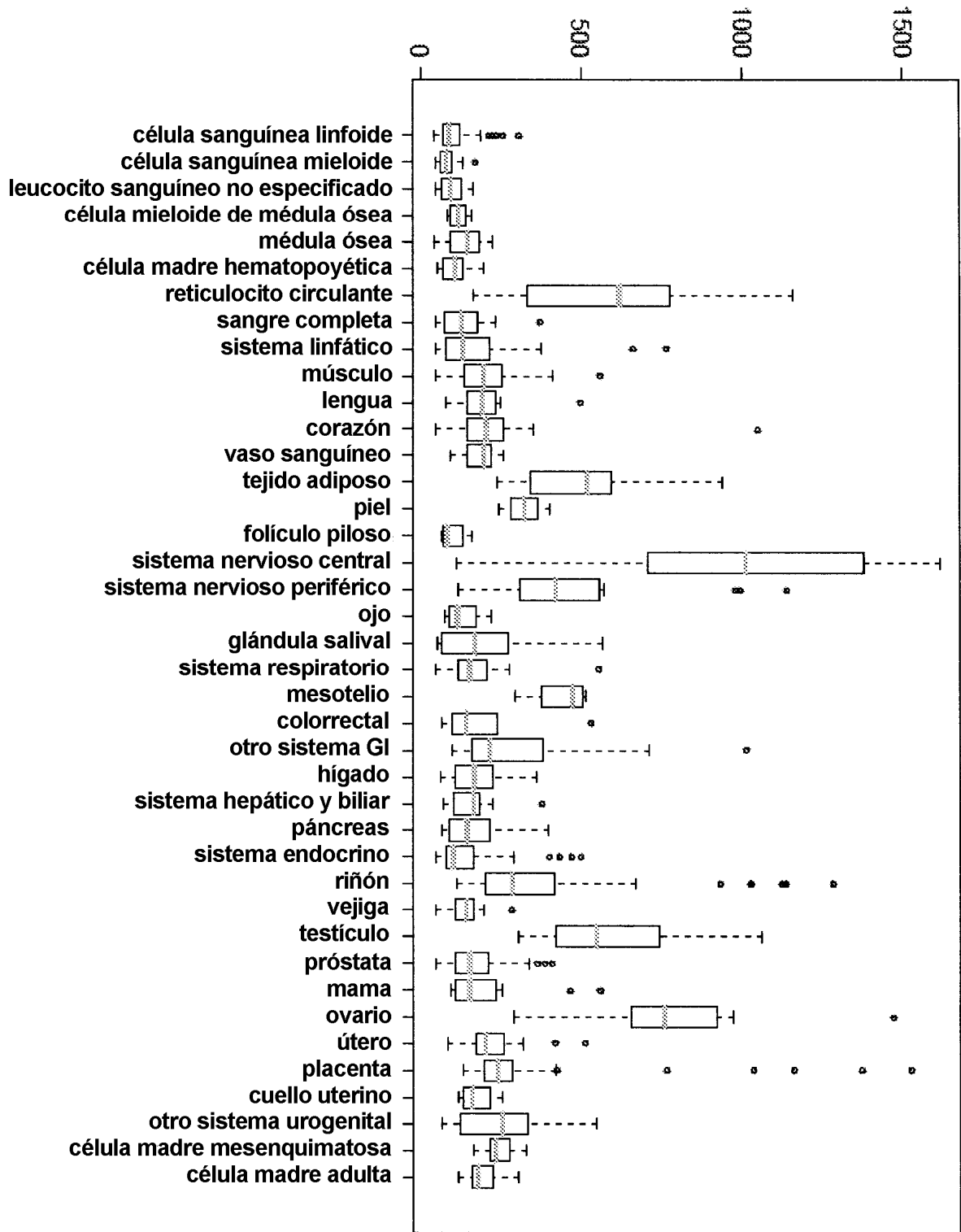


Figura 17

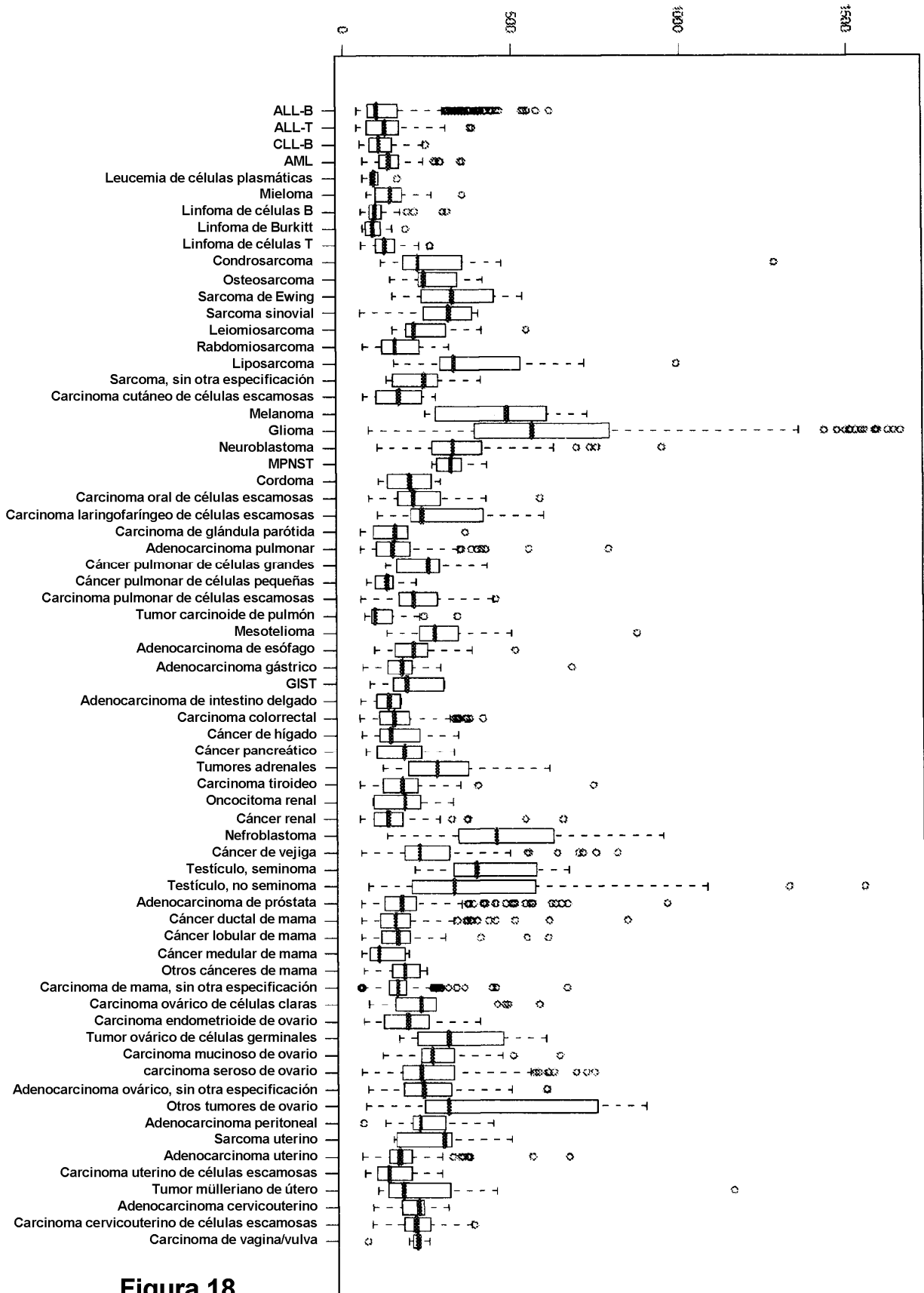


Figura 18