

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 345**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2011 PCT/US2011/022125**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11091305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2011 E 11735264 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2525824**

54 Título: **Inhibición de la señalización AXL en terapia antimetastásica**

30 Prioridad:

**22.01.2010 US 336478 P**

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

**12.09.2017**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)  
Office of the General Counsel Building 170, 3rd  
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386  
Stanford CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**GIACCIA, AMATO J.;  
RANKIN, ERINN BRUNO;  
COCHRAN, JENNIFER R.;  
JONES, DOUGLAS;  
KARIOLIS, MIHALIS;  
FUH, KATHERINE y  
MIAO, YU**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 632 345 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

Inhibición de la señalización AXL en terapia antimetastásica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a invasión tumoral y metástasis, p.ej., tratamientos o diagnósticos de invasión tumoral o metástasis a través de rutas relacionadas con AXL y/o GAS6

10 **Antecedentes de la invención**

La invasión y la metástasis son los aspectos más insidiosos y mortales del cáncer. Mientras que los tumores con una invasión mínima o sin invasión pueden ser extirpados con éxito, una vez que el neoplasma pasa a ser invasivo, se puede diseminar a través de canales linfáticos y/o vasculares a múltiples emplazamientos de manera que la extirpación total resulta muy difícil. La invasión y la metástasis mata al huésped a través de dos procesos: invasión local y lesión y colonización del órgano distante. La invasión local puede comprometer la función de los tejidos implicados por compresión local, destrucción local o prevención de la función normal del órgano. El punto de inflexión más significativo del cáncer es sin embargo el establecimiento de metástasis distante. Llegado a este punto, el paciente ya no puede curarse por terapia local.

El proceso de la metástasis es una cascada de sucesivas etapas relacionadas que implican múltiples interacciones huésped-tumor. Este complejo proceso requiere que las células entren en la circulación vascular o linfática, se detengan en un lecho linfático o vascular distante, se extravasen activamente hacia el intersticio y parénquima del órgano y proliferen como una colonia secundaria. El potencial metastásico está influido por el micro-entorno local, la angiogénesis, las interacciones estroma-tumor, la elaboración de citoquinas del tejido local y por el fenotipo molecular del tumor y las células huésped.

La microinvación puede tener lugar de forma temprana, si bien es posible que la diseminación distante no sea evidente o no haya comenzado aún. Las células tumorales penetran la membrana basal epitelial y entran en el estroma intersticial subyacente durante la transición desde carcinoma in situ a invasivo. Una vez que las células tumorales invaden el estroma subyacente, ganan acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos para su diseminación distante al mismo tiempo que liberan fragmentos de matriz y factores de crecimiento. Durante la transición de carcinoma benigno a invasivo, se producen cambios generales y generalizados en la organización, distribución y cantidad de la membrana basal epitelial.

El esfuerzo terapéutico para prevenir y tratar el cáncer está siendo enfocado al estudio de la señalización de las rutas o proteínas moduladoras selectivas. Las actividades de la proteína quinasa, la homeostasia del calcio y la activación de oncoproteína son señales de activación y por tanto pueden ser sitios reguladores clave para la intervención terapéutica. Las quinasas en las rutas de señalización que regulan la invasión y la angiogénesis pueden constituir importantes reguladores de la metástasis. Una de las clases más extensas de dianas moleculares bioquímicas es la familia de los receptores tirosina quinasa (RTK). Las dianas moleculares de receptor tirosina quinasa más comunes hasta la fecha son los receptores de FCE y factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV). Otras dianas moleculares de quinasa más recientes incluyen la familia RTK tipo II de c-kit y abl. Se han administrado inhibidores de estas moléculas en combinación con quimioterapia clásica.

Las metástasis son en definitiva responsables de gran parte del padecimiento y mortalidad del cáncer. Existe la necesidad de identificar y dirigirse marcadores funcionales y moleculares que identifiquen células cancerosas metastásicas y generar reactivos para su inhibición específica.

Las publicaciones en este campo incluyen, entre otros, Li et al. *Oncogene*. (2009) 28(39):3442-55; Solicitud de patente estadounidense, 20050186571 de Ullrich et al.; Solicitud de patente estadounidense 20080293733 de Bearss et al.; Sun et al. *Oncology*. 2004; 66(6):450-7; Gustafsson et al. *Clin Cancer Res*. (2009) 15(14):4742-9; Wimmel et al. *Eur J Cancer*. 2001 37(17):2264-74; Koorstra et al. *Cancer Biol Ther*. 2009 8(7):618-26; Tai et al. *Oncogene*. (2008) 27(29):4044-55.

El receptor tirosina quinasa AXL (también conocido como Ufo y Tyro7) pertenece a una familia de receptores tirosina que incluye Tyro3 (Sky) y Mer (Tyro12). Un ligando común para la familia AXL es GAS6 (proteína 6 específica de parada del crecimiento). AXL Humano es un marco de lectura abierto de 2.682-pb capaz de dirigir la síntesis de un polipéptido de 894 aminoácidos. Se han caracterizado dos variantes de ARNm, transcrito variante 1, de acceso en el Genbank, NM\_021913.3 y transcrito variante 2, de acceso en NM\_001699.4. La secuencia de polipéptido de la proteína nativa se proporciona como SEQ ID NO: 1, y se puede hacer referencia específica a la secuencia en lo que se refiere a las modificaciones de aminoácido. Entre las funciones celulares importantes de GAS6/AXL se incluyen adhesión celular, migración, fagocitosis e inhibición de apoptosis. GAS6 y los receptores de la familia AXL son altamente regulados en un tejido y de manera específica según la enfermedad.

AXL se caracteriza por una estructura molecular única por el hecho de que la región intracelular tiene la estructura

típica de un receptor tirosina quinasa y el dominio extracelular contiene fibronectina III y motivos Ig similares a las moléculas de adhesión de tipo cadherina. Durante el desarrollo, AXL se expresa en varios órganos, incluyendo el cerebro, lo que indica que este RTK participa en el desarrollo mesenquimal y neuronal. En adultos, la expresión de AXL es baja pero retorna a niveles de expresión altos en diversos tumores. GAS6 es hasta el momento el único ligando de activación para AXL.

Generalmente, los receptores tirosina quinasa (RTK) se activan mediante ligandos que promueven la dimerización de receptor y, a su vez, la autofosforilación de restos de tirosina dentro del dominio citosólico. La unión de proteínas de señalización a estos restos de tirosina fosforilados conduce después a la señalización en dirección 3'. Los RTK de la familia AXL son únicos por el hecho de que son activados por GAS6, un miembro de la familia de proteínas dependientes de vitamina K que se asemeja más bien a los factores de coagulación de la sangre que a los factores de crecimiento típicos.

### Sumario de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que las rutas relacionadas con AXL y/o GAS6 están relacionadas con la invasión tumoral y/o metástasis. En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones y métodos útiles para tratar la invasión tumoral y/o metástasis, p.ej., a través de la inhibición de las rutas relacionadas con AXL y/o GAS6. Asimismo, la presente invención proporciona reactivos y métodos útiles para determinar la susceptibilidad o probabilidad de que un tumor se convierta en invasivo y/o metastásico, p.ej. detectando el nivel de actividad de AXL y/o GAS6. La invención proporciona polipéptidos variantes de AXL soluble tal como se define en la reivindicación 1.

Asimismo, se describen polipéptidos variantes de AXL soluble, en los que dichos polipéptidos carecen del dominio transmembrana de AXL y, opcionalmente, dominio intracelular, y comprenden al menos una modificación de aminoácido en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre, y en los que dicho cambio aumenta la afinidad de unión del polipéptido AXL a GAS6. En algunos ejemplos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende al menos una modificación de aminoácido dentro de una región seleccionada del grupo que consiste en: 1) entre 15-50, 2) entre 60-120, y 3) entre 125-135 de la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En otros ejemplos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende al menos una modificación de aminoácido en la posición 19, 23, 26, 27, 32, 33, 38, 44, 61, 65, 72, 74, 78, 79, 86, 87, 88, 90, 92, 97, 98, 105, 109, 112, 113, 116, 118, 127 o 129 de la secuencia AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de las mismas. En otros ejemplos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 1) A19T, 2) T23M, 3) E26G, 4) E27G o E27K, 5) G32S, 6) N33S, 7) T38I, 8) T44A, 9) H61 Y, 10) D65N, 11) A72V, 12) S74N, 13) Q78E, 14) V79M, 15) Q86R, 16) D87G, 17) D88N, 18) I90M o I90V, 19) V92A, V92G o V92D, 20) I97R, 21) T98A o T98P, 22) T105M, 23) Q109R, 24) V112A, 25) F113L, 26) H116R, 27) T118A, 28) G127R o G127E, y 29) E129K y combinaciones y equivalentes conservadores de las mismas.

En algunos ejemplos más, el polipéptido variante de AXL soluble comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) valina 92; y (d) glicina 127. En una realización, el polipéptido variante de AXL soluble contiene el resto glicina 32 reemplazado con un resto serina, resto ácido aspártico 87 reemplazado con un glicina resto, resto valina 92 reemplazado con un resto alanina y resto glicina 127 reemplazado con un resto arginina. En otros ejemplos más, el polipéptido variante de AXL soluble comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) ácido glutámico 26; (b) valina 79; (c) valina 92; y (d) glicina 127. En otra realización, el péptido variante AXL soluble contiene un resto ácido glutámico 26 reemplazado con un resto glicina, resto valina 79 reemplazado con un resto metionina, valina 92 reemplazado con un resto alanina y resto glicina 127 reemplazado con un resto ácido glutámico.

En otras realizaciones más, el polipéptido variante de AXL soluble comprende al menos aminoácidos 1-437,19-437, 130-437, 19-132, 1-132 del polipéptido AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones más, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc.

En una realización, el polipéptido variante de AXL soluble tiene una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-5}$  M para GAS6. En otra realización, el polipéptido variante de AXL soluble tiene una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M, para GAS6. En otra realización más, el polipéptido variante de AXL soluble tiene una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M para GAS6. En otra realización más, el polipéptido variante de AXL soluble tiene una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M para GAS6. En otra realización más, el polipéptido variante de AXL soluble tiene una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M, o  $1 \times 10^{-12}$  M para GAS6. En varias realizaciones descritas en el presente documento, el polipéptido variante de AXL soluble presenta una afinidad para GAS6 que es al menos aproximadamente 2 veces más fuerte que la afinidad del polipéptido AXL de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el polipéptido variante de AXL soluble presenta una afinidad para GAS6 que es al menos aproximadamente 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, o 30 veces más fuerte que la afinidad del polipéptido AXL de tipo silvestre.

Se describen también anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a una proteína

GAS6 (SEQ ID NO: 2). En algunos casos, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario (ScFv), o una combinación de los mismos. En otros casos, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo se une a un epítipo comprendido en una o más regiones de aminoácido de GAS6 seleccionadas del grupo que consiste en R299-T317, V364-P372, R389-N396, D398-A406, E413-H429, y W450-M468. En otros casos más aún, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo se une a un epítipo comprendido en una región de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en RMFSGTPVIRLRFKRLQPT (SEQ ID NO: 3), VGRVTSSGP (SEQ ID NO: 4), RNLVIKVN (SEQ ID NO: 5), DAVMKIAVA (SEQ ID NO: 6), ERGLYHLNLTVGGIPFH (SEQ ID NO: 7), and WLNGEDTTIQETVKVNTRM (SEQ ID NO: 8).

En otra realización más, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido variante de AXL soluble de la reivindicación 1 para métodos de tratamiento, reducción o prevención de metástasis o invasión de un tumor en un paciente mamífero. En una realización, el método comprende la administración a dicho paciente de una dosis eficaz de un polipéptido variante de AXL soluble o un anticuerpo anti-GAS6 aislado o fragmento del mismo.

Se describen también métodos de tratamiento, reducción o prevención de metástasis o invasión de un tumor en un paciente mamífero. En un caso, el método comprende la administración de uno o más inhibidores seleccionados del grupo que consiste en (a) un inhibidor de la actividad de AXL (b) un inhibidor de la actividad de GAS6; y (c) un inhibidor de la interacción AXL-GAS6. En varios casos descritos en el presente documento, el inhibidor es un polipéptido, un polinucleótido, una molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un conjugado anticuerpo-fármaco.

Se describen también métodos para determinar la capacidad de invasión o metástasis de un tumor en un paciente. En un caso, el método comprende la detección del nivel de actividad AXL y/o actividad GAS6 en una muestra biológica de un paciente con un tumor, en comparación con el nivel de actividad AXL y/o GAS6 en la muestra biológica a un nivel determinado previamente, en la que un aumento con respecto al nivel determinado previamente es indicativo de una predisposición a invasión o metástasis del tumor.

#### Breve descripción de los dibujos

**Figura 1.** La expresión de AXL guarda una correlación con la progresión del tumor y la metástasis en cáncer de mama y de ovario humano. A. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica en tejido de mama normal (normal), carcinoma infiltrante ductal primario (grado 2, 2 y 3) y metástasis a ganglio linfático (ganglio linfático). Advértase que estuvieron presentes niveles altos de tinción de AXL membranosa grado 2 (flechas), grado 3 y metástasis de ganglio linfático. No se observó tinción de AXL en estroma normal y tumoral (\*). B. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica de AXL en epitelio ovárico normal (flecha), estadio II, estadio III y metástasis omental, derivada de pacientes con adenocarcinoma seroso. Advértase que estroma normal y tumoral fueron negativos para la tinción AXL (\*).

**Figura 2.** La inactivación genética de AXL es suficiente para bloquear metástasis en la mama y el ovario. A. Tinción inmunohistoquímica H&E y AXL en los pulmones de ratones a los que se les ha inyectado por la vena caudal secuencia desordenada pequeña (shscramble) (shSCRM) y células MDA-231shAXL (shAXL). Las fotografías son representativas de 5 ratones por grupo. Los gráficos representan análisis de PCR en tiempo real de expresión de GASPDP humana y AXL en todo el pulmón de ratones a los que se les había inyectado células MDA-231 shSCRM o shAXL (n=5) B. Fotografías de ratones tomadas 28 días después de la inyección de shscramble (shSCRM) y células SKOV3ip.1shAXL (shAXL). Advértase que los ratones en los que se inyectó shSCRM desarrollaron numerosas metástasis en toda la cavidad abdominal (marcada con un círculo). Para el grupo shAXL, se muestra el ratón con la mayor carga tumoral. Los gráficos de la derecha representan el número medio de metástasis peritoneales por ratón >5 mm de tamaño y el peso medio de los tumores más grandes. Las fotografías son representativas de 5 ratones por grupo. C. Fotografías de ratones tomadas 34 días después de la inyección de células OVCAR-8 shSCRM y shAXL. Advértase que los ratones en los que se inyectó shSCRM desarrollaron numerosas metástasis en toda la cavidad abdominal (marcada con un círculo). Los gráficos de la derecha representan el número medio de metástasis en total peritoneales por ratón y el peso medio de tumor en total. Las fotografías son representativas de 8 ratones por grupo.

**Figura 3.** La inactivación genética de AXL no afecta a la proliferación *in vitro* o crecimiento *in vivo* de células tumorales de mama y ovario. A. Curvas de crecimiento celular para células MDA-231, SKOV3ip.1, y OVCAR-8 que expresan de forma estable secuencias dirigidas a shARN desordenadas para control (shSCRM) o AXL (shAXL). Se realizaron las medidas por triplicado y las barras de error representan el S.E.M. B. Volumen medio de tumor de tumores ortópico MDA-231 (n=8 ratones por grupo) y subcutáneo SKOV3ip.1 (n = 4 ratones por grupo) cultivados durante el transcurso de 48 días. Las barras de error representan el S.E.M.

**Figura 4.** AXL regula la invasión de célula tumoral de mama y ovárica *in vitro*. A. Ensayo de invasión de colágeno de control (shSCRM) y células MDA-231, SKOV3ip.1, y OVCAR-8 AXL deficientes (shAXL) Las fotografías son representativas de 3 muestras por grupo y fueron tomadas 7 días después de la siembra en placa de células en colágeno. Advértase el fenotipo invasivo observado en células AXL de tipo silvestre (ramificadas) en comparación con células AXL deficientes (redondeadas). Los gráficos presentan la cuantificación de ensayos de invasión de colágeno. B. Análisis de PCR en tiempo real de expresión de MMP-2 en células SKOV3ip.1 shAXL y shSCRM. Los valores de expresión se normalizaron a 18S; n = 3. Las barras de error representan el

S.E.M. Los asteriscos indican un aumento o descenso significativo de la expresión en comparación con shSCRM según se determina mediante ensayo t de Student (\*\*,  $P < 0,001$ ). C. Ensayo indicador de MMP-2 de células SKOV3ip.1 shSCRM o shAXL ( $n = 6$ ). D. Ensayo de zimografía en gelatina para determinar la actividad de pro-MMP2 y MMP2 activa en medios acondicionados recogidos de células SKOV3ip.1 privadas de suero. E. Análisis de transferencia de Western de expresión de fosfo-AKT en Ser473 (P-AKT), AKT total (AKT) y de AXL en células SKOV3ip.1 que expresan secuencias shARN dirigidas a la secuencia desordenada de control (shSCRM) o células SKOV3ip.1 AXL (shAXL) y privadas (strve) tratadas con GAS6 o el inhibidor PI3K Ly294002 (Ly) con GAS6. F. Ensayo de indicador de MMP-2 en células SKOV3ip.1 privadas (strve) tratadas con GAS6 o GAS6 con el inhibidor PI3K Ly294002 (Ly+GAS6).

**Figura 5.** La terapia de ectodominio de AXL soluble inhibe la señalización de AXL y la invasión *in vitro*. A. Representación esquemática del mecanismo de la terapia de AXL soluble. AXL soluble (sAXL) funciona como receptor señuelo para inhibir la señalización de AXL endógena. B. Análisis de transferencia de Western de expresión de fosfo-AKT en Ser473 (P-AKT), AKT total (AKT), y de AXL en células MDA231, SKOV3ip.1 y OVCAR-8 que expresan secuencias shARN dirigidas a la secuencia desordenada de control (shSCRM) o células SKOV3ip.1 AXL (shAXL) y privadas (strve) tratadas con GAS6 o el inhibidor PI3K Ly294002 (Ly) con GAS6. C. Análisis de transferencia de Western de expresión fosfo-AKT Ser473 en células tratadas con medios acondicionados que contienen receptor AXL soluble (sAXL) o medios de control (-). Todas las células fueron privadas durante 48 horas y tratadas con GAS6 (+) o vehículo (-). D. Ensayo de invasión de colágeno en células MDA-231 tratadas con medios acondicionados que contienen vector de control o sAXL.

**Figura 6.** El tratamiento con receptores AXL soluble inhibe la carga de tumor metastásico en ratones con metástasis establecida. A. Representación esquemática de estudio de tratamiento con receptor AXL soluble. Se inyectaron i.p.  $1 \times 10^6$  células SKOV3ip.1 a ratones desnudos. Cinco días después de la implantación, se verificó la presencia de lesiones macroscópicas en los ratones (se muestra una fotografía representativa de un ratón con metástasis peritoneal el día 5 tras la inyección, las lesiones metastásicas están marcadas con un círculo). El día 7, los ratones fueron inyectados con adenovirus de expresión de control IgG2a-Fc (Ad-Fc) o receptor AXL soluble (Ad-sAXL). Se evaluaron los niveles de expresión de sAXL en suero por análisis de transferencia de western cada 3-4 días tras la inyección adenoviral. El día 28 tras la implantación de la célula tumoral, se evaluó la carga tumoral en todos los ratones. B. Fotografías representativas de ratones tratados con adenovirus de expresión de Ad-sAXL o Ad-Fc a los 28 días después de la inyección de célula tumoral. Las lesiones metastásicas están marcadas con un círculo. Los gráficos muestran el número medio de tumores y el peso medio en total para 7 ratones por grupo. Las barras de error representan el S.E.M. Adviértase la diferencia estadística del número y peso de los tumores ( $p=0,01$ , ensayo t de Student) que se observó entre los ratones tratados con Ad-Fc y Ad-sAXL (\*). C. Análisis de PCR en tiempo real de la expresión de MMP-2 en los tumores de los ratones tratados con Ad-Fc o Ad-AXL.

**Figura 7.** La terapia de ectodominio de AXL soluble no induce toxicidad sobre el tejido normal. A. CBC completo y análisis químico de suero de ratones tratados con control (Fc) o terapia de AXL soluble (sAXL). B. Tinción H&E de tejido de hígado y riñón recogido de ratones tratados con Fc o sAXL.

**Figura 8.** Diagrama esquemático que ilustra los mecanismos moleculares asociados con la inhibición de metástasis del receptor AXL soluble. La terapia de receptor AXL soluble (sAXL) funciona como receptor señuelo que se une al ligando GAS6 de AXL. El sAXL inhibe los episodios de señalización de GAS6-AXL endógenos que estimulan la invasión celular y la metástasis.

**Figura 9.** Generación de líneas celulares de cáncer de mama y ovario AXL deficientes. A. Análisis de transferencia de Western de expresión de AXL en un panel de líneas celulares de cáncer de mama y de ovario humanas. Se utilizó la proteína de choque calórico 70 (Hsp70) como control de carga de proteína. B. Análisis de transferencia de Western de expresión AXL en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-231), de ovario (SKOV3ip.1 y OVCAR-8) metastásicas transfectadas de forma estable con secuencias dirigidas a shARN de secuencia desordenada para control (shSCRM) o AXL (shAXL). Adviértase que las líneas celulares shAXL presentan una significativa reducción de la expresión de AXL.

**Figura 10.** AXL no afecta a la adhesión o supervivencia de células tumorales de mama y de ovarios. A-B. Porcentaje de la migración de células MDA-231 (A) y SKOV3ip.1 (B) en ensayos de migración de cámara de Boyden hacia el suero como quimio atrayente. C-D. Análisis de adhesión celular de MDA-231 (A) SKOV3ip.1 (B) a proteínas de matriz extracelular. Abreviaturas: albúmina de suero bobino (BSA), fibronectina (FN), colágeno tipo I (Col I), colágeno tipo IV (Col IV), laminina (LN), fibrinógeno (FBN). Las barras de error representan el error típico medio. E-F. Análisis de supervivencia de AXL tipo silvestre y células tumorales AXL deficientes MDA-231 (E) y SKOV3ip.1 (F) seguido de la retirada de suero, tal como se determina según el ensayo XTT.

**Figura 11.** El tratamiento con receptores AXL soluble inhibe la carga tumoral metastásica en ratones con metástasis OVCAR-8 establecida. A. Representación esquemática del estudio de tratamiento con receptor AXL soluble. Se inyectaron  $5 \times 10^6$  células OVCAR-8 a ratones desnudos. Cuarenta días después de la implantación, se verificó la presencia de lesiones macroscópicas en los ratones (se muestra una fotografía representativa de un ratón con metástasis peritoneal el día 14 después de la inyección, las lesiones metastásicas están marcadas con un círculo). El día 14 se inyectó a los ratones con adenovirus de expresión de control IgG2a-Fc (Ad-Fc) o receptor AXL soluble (Ad-sAXL). Se evaluaron los niveles de expresión de sAXL en suero por análisis de transferencia de Western. El día 34, tras la implantación de célula tumoral, se evaluó la carga tumoral en todos los ratones. B. Fotografías representativas de ratones tratados con adenovirus de expresión Ad-sAXL o Ad-Fc a los 28 días después de la inyección de célula tumoral. Las lesiones metastásicas están marcadas con un círculo. C. El gráfico muestra el número y el peso medio de tumores en total para 8 ratones o grupo. Las barras de error

representan el S.E.M. Adviértase que se observó una diferencia estadística en el número y peso de los tumores ( $p < 0,01$ , ensayo t de Student) entre ratones tratados con Ad-Fc y Ad-sAXL (\*).

**Figura 12.** Unión de productos AXL de biblioteca de 5 ronda de clasificación a GAS6. El gráfico de puntos de la citometría de flujo de células de levadura que expresan AXL de tipo silvestre (A) o los productos AXL agrupados de ronda 5 de clasificación del trabajo de evolución dirigido (B). Los datos demuestran la unión tras los ensayos de velocidad de disociación descritos en el Ejemplo 2. Los niveles de unión a Gas6 2 nM se presentan en la columna de la izquierda, los niveles de unión a Gas6 tras 4 horas de una etapa de disociación se presentan en la columna central y los niveles de unión a Gas6 tras 6 horas de la etapa de disociación se presentan en la columna de la derecha. Para las células que son positivas para la expresión de la proteína en particular en su superficie celular (cuadrante derecho izquierdo de cada gráfico de puntos de la citometría de puntos), los niveles de unión a Gas6 (eje de las y) se cuantificó en el gráfico de barras de abajo. Los productos de la 5 ronda de clasificación agrupados presentaron una unión a Gas6 significativamente mejorada en comparación con AXL de tipo silvestre.

**Figura 13.** Unión de variantes AXL potenciadas a GAS6. El panel de la izquierda presenta la unión en equilibrio hacia Gas6 de los mutante AXL S6-1 (cuadrados rojos) y S6-2 (rombos azules) en comparación con AXL de tipo silvestre (círculos verdes). Los mutantes S6-1 y S6-2 presentaron niveles de unión significativamente más altos a concentraciones más bajas de Gas6, lo que demuestra una afinidad de unión más fuerte a estos mutantes en comparación con el AXL de tipo silvestre. El panel de la derecha presenta la cinética de disociación de la interacción Gas6-AXL de tipo silvestre o de ingeniería. La interacción GAS6-AXL de tipo silvestre ("tipo silvestre") se disocia rápidamente en función del tiempo, mientras que la interacción por obtenida por ingeniería entre Gas6 y S6-1 ("S6-1") o S6-2 ("S6-2") presenta una retención de unión significativamente mayor.

**Figura 14.** La entrega intraperitoneal de AXL S6-1-Fc purificado presenta una potenciación del efecto terapéutico con respecto a AXLFc de tipo silvestre y AXL E59R/T77R-Fc. Se muestran dos imágenes representativas de las necropsias de ratones de tres grupos de tratamiento, AXL E59R/T77R-Fc, AXL-Fc tipo silvestre, y AXL S6-1-Fc. Los círculos negros indican lesiones metastásicas visibles en las imágenes pero no indican necesariamente todos los sitios metastásicos. AXL-Fc de tipo silvestre presenta una inhibición moderada de la metástasis con respecto al control negativo, AXL E59R/T77R, mientras que AXL S6-1 presenta una inhibición de la metástasis casi completa.

**Figura 15.** Inhibición de la metástasis en un modelo de xenoinjerto SKOV3ip.1. En los gráficos de arriba se presentan el mismo conjunto de datos de dos formas diferentes para indicar el número medio de lesiones metastásicas contadas en cada grupo de tratamiento. De manera similar, los dos gráficos de abajo presentan el mismo conjunto de datos que describen el peso total de todas las metástasis extirpadas de ratones de cada grupo de tratamiento. AXL-Fc de tipo silvestre inhibe la propagación de la metástasis en comparación con el control negativo E59R/T77R-Fc, tal como lo indica un descenso tanto en el número de lesiones (panel de arriba) como en el peso global (panel de abajo). AXL S6-1-Fc presenta una significativa reducción de la carga tumoral en comparación con, tanto AXL-Fc de tipo silvestre como AXL E59R/T77R-Fc, tal como se evalúa por el número de lesiones (panel de arriba), así como el peso global (panel de abajo). Estos datos demuestran que la potenciación de la afinidad de AXL S6-1 ofrece una mejor eficacia terapéutica con respecto al tipo silvestre y que AXL S6-1-Fc es un tratamiento viable para controlar la metástasis.

## Definiciones

En la descripción que sigue, se utilizan de manera pormenorizada una serie de términos utilizados convencionalmente en el campo del cultivo celular. A fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, así como del alcance que se les da a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

"Inhibidores," "activadores," y "moduladores" de AXL en células metastásicas o su ligando GAS6 se utilizan para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas mediante el uso de ensayos *in vitro* e *in vivo* de la unión o señalización del receptor o el ligando, p.ej. ligandos, receptores, agonistas, antagonistas y sus homólogos y miméticos.

Los términos "polipéptido," "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por un código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican después, p.ej. hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácido se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química que un aminoácido natural, es decir un

- alpha. carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p.ej. homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (p.ej. norleucina) o cadenas principales de péptido modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Miméticos de aminoácido se refiere a compuestos químicos que

tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido pero que funcionan de manera similar a un aminoácido natural. Todas las letras mayúsculas sueltas utilizadas en la presente invención para representar aminoácidos se utilizan de acuerdo con los símbolos de aminoácidos reconocidos rutinariamente en este campo, p.ej. A significa alanina, C significa Cisteína, etc. Un aminoácido se representa con una letra mayúscula antes o después de la posición correspondiente para reflejar el cambio del aminoácido original (antes de la posición) al aminoácido cambiado (después de la posición). Por ejemplo A19T significa que el aminoácido alanina en la posición 19 está cambiado por treonina.

Los términos “sujeto”, “Individuo” y “paciente” se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un mamífero al que se evalúa para tratamiento y/o que está siendo tratado. En una realización, el mamífero es un ser humano. Los términos “sujeto”, “individuo” y “paciente” abarcan por tanto individuos que tienen cáncer, incluyendo, sin limitación, adenocarcinoma de ovario o próstata, cáncer de mama, glioblastoma, etc., incluyéndose los que han sido sometidos a extirpación (cirugía) o son candidatos de ella para eliminar el tejido canceroso. Los sujetos pueden ser humanos, pero también incluyen otros mamíferos, en particular mamíferos útiles como modelos de laboratorio para enfermedades humanas, p.ej. ratón, rata, etc.

El término “tumor”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a crecimiento o proliferación de célula neoplásica, ya sea maligna o benigna, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

Los términos “cáncer”, “neoplasma” y “tumor” se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a células que presentan un crecimiento autónomo, no regulado, de manera que presentan un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una significativa pérdida de control sobre la proliferación celular. En general, las células de interés para detección, análisis, clasificación o tratamiento en la presente solicitud incluyen precancerosas (p.ej. benignas), malignas, pre-metastásicas, metastásicas y no metastásicas. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, sin limitarse a ellos, cáncer de ovario, glioblastoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer del pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, carcinoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello y cáncer del cerebro.

“Patología” de cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Entre ellos se incluyen, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos de secreción a niveles anormales, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, pre-malignidad, malignidad, invasión de los tejidos u órganos circundantes o distantes, como por ejemplo ganglios linfáticos, etc.

Tal como se utiliza en el presente documento “recurrencia del cáncer” o “recurrencia del tumor”, así como las variaciones gramaticales de los mismos, se refiere a un crecimiento posterior de las células neoplásicas o cancerosas tras el diagnóstico del cáncer. En particular, la recurrencia puede tener lugar cuando las células de un tumor se diseminan en tejidos u órganos locales o distantes; por tanto, “propagación del tumor” abarca metástasis de tumor. La “invasión de tumor” tiene lugar cuando la propagación del crecimiento del tumor se sale del entorno local para comprometer la función de los tejidos relacionados por compresión, destrucción o impedimento de la función del órgano.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “metástasis” se refiere al crecimiento de un tumor canceroso en un órgano o una parte del organismo que no está directamente conectado con el órgano del tumor canceroso original. Se entenderá por metástasis también micrometástasis, que es la presencia de una cantidad no detectable de células cancerosas en un órgano o una parte del organismo, que no está conectado directamente con el órgano del tumor canceroso original. La metástasis se puede definir asimismo como varias etapas de un proceso, como por ejemplo la salida de células cancerosas desde un sitio de tumor original y la migración y/o invasión de células cancerosas a otras partes del organismo. Por lo tanto, la presente invención contempla un método para determinar el riesgo de un posterior crecimiento de uno o más tumores cancerosos en un órgano o parte del organismo que no está directamente conectado con el órgano del tumor canceroso original y/o las etapas de un proceso que conduce a ese crecimiento.

Dependiendo de la naturaleza del cáncer, se obtiene una muestra apropiada del paciente. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “muestra de tejido canceroso” se refiere a cualquier célula obtenida de un tumor canceroso. En el caso de tumores sólidos que no han metastatizado, normalmente se obtendrá una muestra de tejido del tumor extirpado quirúrgicamente y se preparará para su análisis a través de técnicas convencionales.

La definición abarca muestras de sangre y otros líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido, como una muestra de ensayo para biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos y su progenie. La definición incluye también muestras que han sido manipuladas de alguna forma tras su obtención, como por ejemplo tratamiento con reactivos; lavado o enriquecimiento para ciertas poblaciones celulares, como células cancerosas. La definición incluye también una muestra que ha sido enriquecida para tipos de moléculas en particular, p.ej. ácidos nucleicos, polipéptidos, etc. El término “muestra biológica” abarca una muestra clínica y también incluye el tejido obtenido por resección quirúrgica, tejido obtenido por biopsia, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados

celulares, muestras de tejido, órganos, médula ósea, sangre, plasma, suero y similares. "Muestra biológica" incluye una muestra obtenida de una célula cancerosa del paciente, p.ej., una muestra que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtienen de una célula cancerosa del paciente (p.ej., un lisado celular u otro extracto celular que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos); y una muestra que comprende células cancerosas de un paciente. Una muestra biológica que comprende una célula cancerosa de un paciente también puede incluir células no cancerosas.

El término "diagnóstico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la identificación de un estado molecular o patológico, enfermedad o afección, como pueda ser la identificación de un subtipo molecular de cáncer de mama, cáncer de próstata, u otro tipo de cáncer.

El término "pronóstico", se utiliza en el presente documento para referirse a la predicción de la probabilidad de muerte o progresión, incluyendo recurrencia, propagación metastásica y resistencia a fármaco de una enfermedad neoplásica atribuible a cáncer, como por ejemplo cáncer de ovario. El término "predicción" se utiliza en el presente documento para referirse al acto de pronosticar o estimar, sobre la base de la observación, la experiencia o el razonamiento científico. En un ejemplo, un médico puede predecir la probabilidad de que un paciente sobreviva tras la extirpación quirúrgica de un tumor primario y/o quimioterapia durante un período de tiempo determinado sin recurrencia del cáncer.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a la administración de un agente o la realización de un procedimiento (p.ej., radiación, un procedimiento quirúrgico, etc.) con el fin de obtener un efecto. El efecto puede ser profiláctico en lo que se refiere a una prevención completa o parcial de una enfermedad o síntomas de la misma y/o puede ser terapéutico en lo que se refiere a llevar a efecto una cura completa o parcial de una enfermedad y/o síntomas de la enfermedad. "Tratamiento" tal como se utiliza en el presente documento cubre cualquier tratamiento de cualquier tumor metastásico en un mamífero, en particular un ser humano, e incluye: (a) prevención de la aparición de la enfermedad o un síntoma de una enfermedad en un sujeto que pueda tener predisposición a contraer la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado de tenerla (p.ej. incluyendo enfermedades que pueden estar asociadas o ser causadas por una enfermedad primaria); (b) inhibición de la enfermedad, es decir, detención de su desarrollo; y (c) alivio de la enfermedad, es decir, causando la regresión de la enfermedad. En el tratamiento de un tumor (p.ej. cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la metástasis de células tumorales.

Tratamiento se puede referir a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora o prevención de un cáncer, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo como reducción; remisión; disminución de los síntomas o mayor tolerabilidad de la patología sea más tolerable por parte del paciente; ralentización de la velocidad de degeneración o deterioro; o conseguir un punto final de degeneración menos debilitante. El tratamiento o mejora de los síntomas se puede basar en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen realizado por un médico. Por consiguiente, el término "tratamiento" incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para prevenir o retrasar, aliviar o detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o afecciones asociadas con neoplasia, p.ej., tumor o cáncer. El término "efecto terapéutico", se refiere a la reducción, eliminación, o prevención de la enfermedad, síntomas de la enfermedad, o efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto.

"En combinación con", "terapia de combinación" y "productos de combinación" se refieren, en ciertas realizaciones, a la administración simultánea a un paciente de un primer compuesto terapéutico y los compuestos utilizados en el presente documento. Cuando se administran en combinación, cada componente se puede administrar al mismo tiempo o de forma secuencial en cualquier orden en diferentes momentos. Por lo tanto, cada componente se puede administrar por separado pero con la suficiente proximidad en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

De acuerdo con la presente invención, el primer producto terapéutico puede ser cualquier agente terapéutico adecuado, p.ej., agentes citotóxicos. Una clase de agentes citotóxicos que puede servir como ejemplo está constituida por los agentes quimioterapéuticos, p.ej., se pueden combinar con el tratamiento para inhibir de AXL o señalización de GAS6. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen, sin limitarse a ellos, aldesleucina, altretamina, amifostina, asparaginasa, bleomicina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cladribina, cisaprida, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, doxorubicina, dronabinol, duocarmicina, epoetina alfa, etoposida, filgrastim, fludarabina, fluorouracil, gemcitabin, granisetron, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, interferón alfa, irinotecano, lansoprazol, levamisol, leucovorina, megestrol, mesna, metotrexato, metoclopramida, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, omeprazol, ondansetrón, paclitaxel (Taxol™), pilocarpina, procloroperazina, rituximab, saproin, tamoxifeno, taxol, topotecan clorhidrato, trastuzumab, vinblastina, vincristina y tartrato de vinorelbina. Para el tratamiento de cáncer de ovario, un agente quimioterapéutico de preferencia con el que se puede combinar un inhibidor de AXL o GAS6 es paclitaxel (Taxol™).

Otras terapias de combinación son radiación, cirugía y deprivación hormonal (Kwon et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 96: 15074-9, 1999). También se pueden combinar con los métodos de la invención inhibidores de la angiogénesis.

"Administración conjunta" de un fármaco terapéutico contra el cáncer conocido y una composición farmacéutica de la

presente invención significa la administración del fármaco y el inhibidor de AXL en un momento preciso en que el fármaco conocido y la composición de la presente invención tengan un efecto terapéutico. Dicha administración conjunta puede implicar la administración simultánea (es decir, al mismo tiempo), previa o posterior a la administración del fármaco en relación con la administración del compuesto de la presente invención. Las personas especializadas en la técnica no tendrán dificultad en determinar el momento, la secuencia y la posología apropiada para la administración de los fármacos en particular y las composiciones de la presente invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “supervivencia sin enfermedad” se refiere a la ausencia de la recurrencia del tumor y/o propagación y futuro del paciente tras el diagnóstico, con respecto los efectos del cáncer sobre la esperanza de vida del paciente. La expresión “supervivencia global” se refiere al futuro del paciente tras el diagnóstico, independientemente de la posibilidad de que la causa de la muerte del paciente no se deba a los efectos del cáncer. Las expresiones “probabilidad de supervivencia sin enfermedad”, “riesgo de recurrencia” y variaciones de las mismas, se refieren a la probabilidad de recurrencia o propagación del tumor en un paciente tras el diagnóstico de cáncer, en el que la probabilidad se determina de acuerdo con el proceso de la invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “se correlaciona” o “se correlaciona con” y los términos similares, se refiere a una asociación estadística entre los casos de dos episodios, incluyéndose entre los episodios, números, grupos de datos y similares. Por ejemplo, cuando los episodios implican números, una correlación positiva (también denominada en el presente documento “correlación directa”) significa que cuando uno aumenta, el otro aumenta también. Una correlación negativa (también denominada en el presente documento “correlación inversa”) significa que cuando uno aumenta, el otro disminuye.

“Dosis unitaria” se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosis unitarias para el individuo al que se está tratando en particular. Cada unidad puede contener una cantidad determinada previamente del ingrediente(s) activo(s) calculada para producir el efecto(s) terapéutico(s) deseado(s) en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación de las formas de dosis unitaria puede estar dictada por (a) las características únicas del (los) ingrediente(s) activo(s) y el (los) efecto(s) terapéutico(s) que se desean conseguir y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la composición del (los) compuesto(s) activo(s).

“Excipiente farmacéuticamente aceptable” significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente seguro, no tóxico y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para su uso veterinario, así como para su uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición de aerosol, gaseosos.

“Sales y ésteres farmacéuticamente aceptables” significa sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y que tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que se pueden formar cuando los protones ácidos presentes en los compuestos son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Entre las sales orgánicas adecuadas se incluyen las formadas con metales alcalinos, p.ej., sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Entre las sales orgánicas adecuadas se incluyen las que se forman con bases orgánicas, como por ejemplo bases amina, p.ej., etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares. Dichas sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (p.ej., ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (p.ej., ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y ácidos alcano y aren-sulfónicos como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfoniloxi y fosfonoxi presentes en los compuestos, p.ej., ésteres de alquilo de C<sub>1-6</sub>. Cuando hay dos grupos ácido presentes, una sal o éster farmacéuticamente aceptable puede ser una mono-sal o éster o diéster o sal mono-acido; y de manera similar, cuando están presentes más de dos grupos ácidos, algunos o todos estos grupos pueden formar una sal o éster. Los compuestos citados en la presente invención pueden estar presentes sin formar sal o sin formar éster o en forma de sal y/o éster, y debe entenderse que la cita de dichos compuestos incluye tanto el compuesto original (sin formar sal y éster) como sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables). Asimismo, pueden estar presentes determinados compuestos citados en la presente invención en más de una forma estereoisómera y debe entenderse que la cita de dichos compuestos incluye todos los estereoisómeros por separado y todas sus mezclas (ya sean racémicas o de otro tipo) de dichos estereoisómeros.

Los términos “farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente tolerable” y las variaciones gramaticales de los mismos, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se utilizan indistintamente y se aluden a que los materiales se pueden administrar a un ser humano sin que produzcan efectos fisiológicos no deseables hasta el punto de prohibir la administración de dicha composición.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad que al ser administrada a un sujeto para tratar una enfermedad” es suficiente para llevar a efecto el tratamiento de dicha enfermedad.

### Descripciones detalladas

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan variantes de AXL soluble, p.ej., polipéptidos variantes de AXL soluble que tienen una actividad de unión a GAS6 que es sustancialmente igual o mejor que la actividad de unión del polipéptido AXL de tipo silvestre. En algunas realizaciones de la invención, el polipéptido variante de AXL

soluble se utiliza como agente terapéutico.

La proteína AXL, con referencia a la secuencia nativa de SEQ ID NO: 1, comprende un dominio de tipo inmunoglobulina (Ig) desde los restos 27-128, un segundo dominio de tipo Ig desde los restos 139-222, 3 dominios de tipo fibronectina desde los restos 225-332 y 333-427, dominio intracelular desde los restos 473-894 incluyendo dominio tirosina quinasa. Los restos tirosina en 779, 821 y 866 se autofosforilan tras la dimerización del receptor y sirven como sitios de acoplamiento para moléculas de señalización intracelular. El sitio de segmentación nativo para liberar la forma soluble del polipéptido se sitúa en los restos 437-451.

Para los fines de la invención, una forma soluble de AXL es la porción del polipéptido que es suficiente para unirse a GAS6 con una afinidad reconocible, p.ej., alta afinidad, que se sitúa normalmente entre la secuencia de señal y el dominio de transmembrana, es decir, generalmente desde aproximadamente SEQ ID NO: 1 resto 19-437, pero que puede comprender o consistir esencialmente en una versión truncada desde aproximadamente resto 19, 25, 30, 35, 40, 45, 50 a aproximadamente resto 132, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 375, 350, a 321, p.ej., resto 19-132. La forma soluble de AXL carece de dominio transmembrana y, opcionalmente, del dominio intracelular.

Los polipéptidos variantes de AXL soluble (variantes sAXL) de la presente invención incluyen una o más modificaciones de aminoácido dentro de la forma soluble de AXL de tipo silvestre, tal como se define en la reivindicación 1, p.ej., una o más modificaciones de aminoácido que aumentan su afinidad para GAS6. Las modificaciones de aminoácido incluyen una o más modificaciones de aminoácido naturales o artificiales conocidas o que se puedan descubrir en el futuro en este campo. En algunos casos, las modificaciones de aminoácido incluyen una mutación natural, p.ej., sustitución, delección, adición, inserción, etc. En algunos casos, las modificaciones de aminoácido incluyen reemplazamiento de un aminoácido existente con otro aminoácido, p.ej., un equivalente conservador del mismo. En otros casos más, las modificaciones de aminoácido incluyen reemplazamiento de uno o más aminoácidos existentes con aminoácidos naturales o inserción de uno o más aminoácidos de origen no natural. En otros casos más, las modificaciones de aminoácido incluyen al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o 10 cambios o mutaciones de aminoácido.

En algunas realizaciones ilustrativas, las modificaciones de aminoácido se pueden utilizar para alterar las propiedades de la forma soluble de AXL, p.ej., afectando la estabilidad, la actividad de unión y/o la especificidad, etc. Las técnicas para mutagénesis de genes clonados *in vitro* son conocidas. En Gustin et al., *Biotechniques* 14:22 (1993); Barany, *Gene* 37:111-23 (1985); Colicelli et al., *Mol Gen Genet* 199:537-9 (1985); y Prentki et al., *Gene* 29:303-13 (1984) se pueden encontrar ejemplos de protocolos para explorar mutaciones. En Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, pp. 15.3-15.108; Weiner et al., *Gene* 126:35-41 (1993); Sayers et al., *Biotechniques* 13:592-6 (1992); Jones and Winistorfer, *Biotechniques* 12:528-30 (1992); Barton et al., *Nucleic Acids Res* 18:7349-55 (1990); Marotti and Tomich, *Gene Anal Tech* 6:67-70 (1989); y Zhu *Anal Biochem* 177:120-4 (1989) se pueden encontrar métodos de mutagénesis específica de sitio.

Tal como se describe en el presente documento, las variantes de sAXL pueden incluir una o más modificaciones de aminoácido dentro de una o más regiones del resto 18 a 130, resto 10 a 135, resto 15 a 45, resto 60 a 65, resto 70 a 80, resto 85 a 90, resto 91 a 99, resto 104 a 110, resto 111 a 120, resto 125 a 130, resto 19 a 437, resto 130 a 437, resto 19 a 132, resto 21 a 132, resto 21 a 121, resto 26 a 132, o resto 26 a 121 del AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En otros casos, las variantes de sAXL de la presente invención incluyen una o más modificaciones de aminoácido dentro de una o más regiones del resto 20 a 130, resto 37 a 124 o resto 141 a 212 del AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En otros casos más, las variantes de sAXL de la presente invención incluyen una o más modificaciones de aminoácido en una o más posiciones entre las posiciones 19, 23, 26, 27, 32, 33, 38, 44, 61, 65, 72, 74, 78, 79, 86, 87, 88, 90, 92, 97, 98, 105, 109, 112, 113, 116, 118, 127 o 129 del AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

En otros casos más, las variantes de sAXL del presente documento pueden incluir una o más modificaciones de aminoácido incluyendo sin limitación 1) A19T, 2) T23M, 3) E26G, 4) E27G o E27K, 5) G32S, 6) N33S, 7) T38I, 8) T44A, 9) H61 Y, 10) D65N, 11) A72V, 12) S74N, 13) Q78E, 14) V79M, 15) Q86R, 16) D87G, 17) D88N, 18) I90M o I90V, 19) V92A, V92G o V92D, 20) I97R, 21) T98A o T98P, 22) T105M, 23) Q109R, 24) V112A, 25) F113L, 26) H116R, 27) T118A, 28) G127R o G127E y 29) E129K y combinaciones de las mismas.

En una realización, las variantes de sAXL de la presente invención incluyen las modificaciones de aminoácido en la posición 32, 87, 92 y 127 del AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), G32S; D87G; V92A y/o G127R. En otra realización, las variantes sAXL de la presente invención incluyen las modificaciones del aminoácido en la posición 26, 79, 92, 127 del AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), E26G, V79M; V92A y G127E.

De acuerdo con la presente invención, las variantes de sAXL de la presente invención se pueden modificar además, p.ej., unidas a una extensa variedad de otros oligopéptidos y proteínas para diversos fines. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo diversas modificaciones post-traducción o post-expresión a partir de las variantes sAXL de la presente invención. Por ejemplo, empleando las secuencias de codificación apropiadas, es posible proporcionar farnesilación y prenilación. En algunas realizaciones, las variantes sAXL de la presente invención se pueden pegar, de manera que el grupo polietileno proporciona una potenciación del ciclo vital en la corriente sanguínea. Las variantes sAXL

de la presente invención se pueden combinar también con otras proteínas como el Fc de un isotipo IgG, que se puede unir como complemento con una toxina, como ricina, abrina, toxina de la difteria, o similares, o con agentes de unión específicos que permiten el direccionamiento a fracciones específicas de una célula diana.

5 En algunas realizaciones, la variante de sAXL de la presente invención es una proteína de fusión, p.ej., fusionada en fase de lectura con un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, p.ej., para que la proteína de fusión no sea despejada de la circulación rápidamente. En otras realizaciones, el segundo polipéptido es parte o constituye toda la región Fc. En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar al Fc., p.ej., al proporcionar un mayor tamaño y/o una unión o interacción adicional con las moléculas Ig. En otras realizaciones más, el segundo polipéptido es parte o constituye toda la proteína albúmina, p.ej., proteína albúmina de suero humano.

15 En otras realizaciones, el segundo polipéptido es útil para manipular variantes de sAXL, p.ej., purificación de las variantes de sAXL, o para aumentar su estabilidad *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las variantes de sAXL de la presente invención se pueden combinar con partes del dominio constante de inmunoglobulinas (IgG), con el resultado de polipéptidos quiméricos o de fusión. Dichas proteínas de fusión facilitan la purificación y presentan un mayor ciclo vital *in vivo*. Un ejemplo notificado describe proteínas quiméricas que consisten en los primeros dos dominios de polipéptido CD4 humano y varios dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de mamífero. Patente europea EP A 394,827; Traunecker et al., Nature, 331: 84-86, 1988. Las proteínas de fusión que tienen estructuras diméricas por enlace disulfuro (debido a la IgG) también pueden ser más eficaces para la unión y neutralización de otras moléculas distintas a la proteína secretada monomérica o el fragmento de proteína en solitario. Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964, 1995.

25 En otras realizaciones más, el segundo polipéptido es una secuencia marcadora, como un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. Por ejemplo, la secuencia de aminoácido marcadora, puede ser un péptido hexa-histidina, como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Tal como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 821-824, 1989, por ejemplo, hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otra marca de péptido útil para la purificación, la marca "HA" corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina del virus influenza. Wilson et al., Cell 37: 767, 1984.

35 En algunas realizaciones más, el segundo polipéptido es una entidad útil para mejorar las características de las variantes de sAXL de la presente invención. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicional, aminoácidos con una carga en particular, en el N-término del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia durante la purificación de la célula huésped o la manipulación y el almacenamiento posteriores. Asimismo, se pueden añadir fracciones de péptido a las variantes de sAXL de la presente invención para facilitar la purificación y eliminarse a continuación antes de la preparación final del polipéptido. La adición de fracciones de péptido para facilitar la manipulación de los polipéptidos constituye técnicas de rutina conocidas en la técnica.

40 En otras realizaciones más, las variantes de sAXL de la presente invención tienen una actividad de unión a GAS6 que es al menos igual o mejor que la del AXL de tipo silvestre. En otras realizaciones, las variantes de sAXL de la presente invención tienen una actividad de unión o afinidad a GAS6 que es al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, o 6 veces mayor que la del AXL de tipo silvestre. En otras realizaciones, las variantes sAXL de la presente invención tiene una actividad de unión o afinidad a GAS6 de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  o  $1 \times 10^{-9}$  M. En otras realizaciones más, las variantes de sAXL de la presente invención son capaces de inhibir, inhiben o compiten con la unión de AXL de tipo silvestre a GAS6 *in vivo* o *in vitro* o ambos. En otras realizaciones más, las variantes de sAXL de la presente invención inhiben o compiten con la unión de AXL S6-1, AXL S6-2, y/o AXL S6-5 tal como se proporciona en el Ejemplo 2 de la presente invención. En otras realizaciones más, las variantes de sAXL de la presente invención inhiben o compiten con la unión de cualquier variante de sAXL proporcionada en el Ejemplo 2 de la presente solicitud.

55 La capacidad de una molécula de unirse a GAS6 se puede determinar por ejemplo, por la capacidad de unión del ligando putativo a GAS6 revestido en una placa de ensayo. En una realización, la actividad de unión de variantes de sAXL de la presente invención a GAS6 se puede determinar movilizándolo o bien el ligando, p.ej., GAS6 o bien la variante sAXL. Por ejemplo, el ensayo puede incluir la inmovilización de GAS6 fusionada con una marca His sobre perlas de resina NTA activadas con Ni. Se pueden añadir agentes en un tampón apropiado e incubar las perlas durante un periodo de tiempo y a una temperatura determinados. Después de los lavados para eliminar el material sin unir, se puede liberar la proteína unida por ejemplo con SDS, tampones con pH alto, y similares, y analizar.

60 En otras realizaciones más, las variantes sAXL de la presente invención tienen una mejor estabilidad térmica que la estabilidad térmica de un AXL de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la temperatura de fusión de las variantes sAXL de la presente invención es al menos 5 °C, 10 °C, 15 °C, o 20 °C más que la temperatura de fusión del AXL de tipo silvestre.

65 De acuerdo con la presente invención, las variantes sAXL de la presente invención también pueden incluir una o

más modificaciones que no alteren las secuencias primarias de las variantes sAXL de la presente invención. Por ejemplo, dichas modificaciones pueden incluir derivatización química de polipéptido, p.ej., acetilación, amidación, carboxilación, etc. Dichas modificaciones pueden incluir modificaciones de glicosilación, p.ej., aquellas obtenidas por modificación de los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y tratamiento o en etapas de tratamiento posteriores; p.ej., por exposición del polipéptido a enzimas que afectan la glicosilación, como enzimas de glicosilación o desglucosilación de mamífero. En algunas realizaciones, las variantes sAXL de la presente invención incluyen variante sAXL que tiene restos aminoácido fosforilados, p.ej., fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina.

En otras realizaciones, las variantes sAXL de la presente invención incluyen variantes sAXL modificadas además para mejorar su resistencia a degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o hacerlas más adecuadas como agentes terapéuticos. Por ejemplo, las variantes sAXL de la presente invención pueden incluir además análogos de una variante sAXL que contiene restos de otros L-aminoácidos distintos a los de origen natural, p.ej., D-aminoácidos o aminoácidos de origen no natural. Los D-aminoácidos pueden sustituir algunos o todos los restos aminoácido.

En otras realizaciones más, las variantes sAXL de la presente invención incluyen al menos dos variantes sAXL iguales o diferentes unidas covalentemente o no covalentemente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las variantes sAXL de la presente invención incluyen dos, tres, cuatro, cinco o seis variantes sAXL iguales o diferentes unidas covalentemente, p.ej., para tener el tamaño apropiado pero evitando una agregación no deseada.

De acuerdo con la presente invención, las variantes sAXL de la presente invención se pueden producir a través de cualquier medio conocido o que se pueda descubrir en el futuro en este campo, p.ej., se puede producir a partir de células eucariotas o procariotas, se puede sintetizar *in vitro*, etc. Cuando se produce la proteína mediante células procariotas, puede tratarse posteriormente por desplegamiento, p.ej., desnaturalización térmica, reducción DTT, etc. y se puede volver a plegar otra vez, aplicando los métodos conocidos en la técnica.

Los polipéptidos se pueden preparar por síntesis *in vitro*, utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Están disponibles en el mercado diversos aparatos de síntesis comerciales, como por ejemplo, sintetizadores automáticos de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckman, etc. Con el empleo de sintetizadores, se pueden sustituir aminoácidos naturales por aminoácidos que no son naturales. La secuencia y el modo de preparación en particular serán determinados según siendo conveniente, por criterios de economía, la pureza requerida, y similares.

Los polipéptidos pueden también aislarse y purificarse de acuerdo con métodos convencionales de síntesis recombinante. Se puede preparar un lisado del huésped de expresión y purificarse dicho lisado por HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad y otras técnicas de purificación. Por lo general, las composiciones que se utilizan comprenderán al menos 20 % en peso del producto deseado, más normalmente al menos aproximadamente 75 % en peso, preferentemente, al menos aproximadamente 95 % en peso, y para fines terapéuticos, normalmente, al menos aproximadamente 99,5 % en peso, en relación con los contaminantes asociados al método de preparación del producto y su purificación. Normalmente, los porcentajes se basarán en el total de proteína.

Se pueden emplear los métodos conocidos entre las personas especializadas en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación y señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Estos métodos incluyen por ejemplo técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Alternativamente, se puede sintetizar químicamente ARN capaz de codificar los polipéptidos de interés. Las personas especializadas en la técnica pueden recurrir a tablas de uso de codones y métodos sintéticos para proporcionar una secuencia de codificación adecuada para cualquiera de los polipéptidos de la invención. Los métodos de síntesis química directa incluyen por ejemplo, el método de fosfotriéster de Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99; el método de fosfodiéster de Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151; el método de dietilfosforamida de Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862; y el método de soporte sólido de la patente estadounidense No. 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Éste se puede convertir a un ADN de doble cadena por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con ADN polimerasa utilizando la monocadena como matriz. Si bien la síntesis química de ADN suele estar limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas por ligación de secuencias más cortas. Alternativamente, se pueden clonar sub-secuencias y segmentar las sub-secuencias apropiadas utilizando enzimas de restricción apropiadas.

Se pueden aislar y obtener los ácidos nucleicos con una sustancial pureza. Normalmente, los ácidos nucleicos, ya sea de ADN o ARN, se obtendrán esencialmente libres de otras secuencias de ácido nucleicos naturales, teniendo generalmente una pureza de al menos aproximadamente 50 %, normalmente, al menos aproximadamente 90 % y normalmente son "recombinantes," p.ej., flanqueados por uno o más nucleótidos con los que no se asocian normalmente en un cromosoma natural. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden proporcionar como una molécula lineal o dentro de una molécula circular, y pueden proporcionarse dentro de moléculas de replicación autónoma (vectores) o dentro de moléculas sin secuencias de replicación. La expresión de los ácidos nucleicos se puede regular a través de sus propias secuencias de regulación u otras conocidas en la técnica. Los ácidos

nucleicos de la invención se pueden introducir en células huésped adecuadas empleando diversas técnicas disponibles en la técnica, como transferencia de ADN mediada por polietilenglicol de transferrina, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, transferencia de ADN mediada por liposoma, transporte intracelular de perlas de látex revestidas con ADN, fusión de protoplastos, infección viral, electroporación, biolística, transfección mediada por fosfato cálcico, y similares.

Se describen también vectores de expresión para expresión *in vivo* o *in vitro* de una o más variantes sAXL de la presente invención, ya sea constitutivamente o en virtud de uno o más elementos reguladores. Se describe también una población celular que comprende uno o más vectores de expresión para expresión de variantes sAXL de la presente invención, ya sea constitutivamente o en virtud de uno o más elementos reguladores.

Se describen también anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a proteína GAS6. GAS6 (6 específica de parada del crecimiento) pertenece estructuralmente a la familia de proteínas dependientes de vitamina K del plasma. GAS6 tiene una alta homología estructural con la proteína S anticoagulante natural, ya que comparten la misma composición modular y tienen una identidad de secuencia de 40 %. GAS6 tiene propiedades de tipo factor de crecimiento a través de su interacción con los receptores tirosina quinasa de la familia TAM; Tyro3, AXL y MerTK. GAS6 humana es una proteína de 678 aminoácidos que consiste en un dominio rico en gamma-carboxiglutamato (Gla) que media la unión a membranas de fosfolípido, cuatro dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico y dos dominios de laminina tipo G (LG). Se puede acceder a la secuencia de las variantes de transcrito de GAS6 humana en el Genbank en N\_001143946.1; NM\_001143945.1; y NM\_000820.2, respectivamente.

GAS6 emplea un único mecanismo de acción, al interactuar a través de su módulo GLA (ácido gammacarboxiglutámico) dependiente de vitamina K con membranas que contienen fosfatidilserina y a través de sus dominios LamG carboxi-terminales con los receptores de membrana TAM.

Los anticuerpos aislados descritos en el presente documento incluyen cualquier anticuerpo aislado con una especificidad de unión reconocible contra GAS6. En algunos casos, los anticuerpos aislados son anticuerpos parcial o completamente humanizados. En otros casos, los anticuerpos aislados son anticuerpos monoclonales o policlonales. En otros casos más, los anticuerpos aislados son anticuerpos quiméricos, p.ej., con regiones consistentes, regiones variables y/o CDR3 o una combinación de los mismos de diferentes fuentes. En otros casos más, los anticuerpos aislados son una combinación de varios rasgos descritos en el presente documento.

Tal como se describe en el presente documento, los fragmentos de los anticuerpos aislados incluyen un polipéptido que contiene una región del anticuerpo (ya sea en el contexto de un andamiaje de anticuerpo o un andamiaje sin anticuerpo) que es suficiente o necesario para una unión específica reconocible del polipéptido hacia GAS6. En algunos casos, los fragmentos de los anticuerpos aislados incluyen cadenas ligeras variables, cadenas pesadas variables, uno o más CDR de cadena pesada o cadenas ligeras o combinaciones de ellos, p.ej., Fab, Fv, etc. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpos aislados incluyen un polipéptido que contiene un anticuerpo de cadena simple, p.ej. ScFv. En algunos casos más, los fragmentos de anticuerpos aislados incluyen regiones variables solamente o regiones variables en combinación con parte de la región del Fc, p.ej. región CH1. En algunos casos más, los fragmentos de los anticuerpos aislados incluyen mini-cuerpos, p.ej., VL-VH-CH3 o diacuerpos.

En algunos casos, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido en una o más regiones de aminoácido o presentado por ellas que interactúa con AXL. En otros casos, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido en una o más regiones de GAS6, o presentado por ellas, p.ej., L295-T317, E356-P372, R389-N396, D398-A406, E413-H429 y W450-M468 de GAS6.

En otros casos más, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido en una o más regiones de aminoácido o presentado por ellas, p.ej., LRMFSGTPVIRLRFKRLQPT (SEQ ID NO: 3), EIVGRVTSSGP (SEQ ID NO: 4), RNLVIKVN (SEQ ID NO: 5), DAVMKIAVA (SEQ ID NO: 6), ERGLYHLNLTGIPFH (SEQ ID NO: 7), y WLNGEDTTIQETVVNRM (SEQ ID NO: 8).

En otros casos más, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido o presentado por al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos en una región de L295-T317, E356-P372, R389-N396, D398-A406, E413-H429, y W450-M468 de GAS6. En otros casos más, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido o presentado por al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos en una región de LRMFSGTPVIRLRFKRLQPT (SEQ ID NO: 3), EIVGRVTSSGP (SEQ ID NO: 4), RNLVIKVN (SEQ ID NO: 5), DAVMKIAVA (SEQ ID NO: 6), ERGLYHLNLTGIPFH (SEQ ID NO: 7), y WLNGEDTTIQETVVNRM (SEQ ID NO: 8).

En otros casos más, los anticuerpos aislados son capaces de inhibir, inhiben o compiten con la unión entre AXL de tipo silvestre o variantes sAXL de la presente invención y GAS6.

De acuerdo con la presente invención, las variantes sAXL y los anticuerpos aislados se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticas adecuadas para uso terapéutico, p.ej., para tratamiento humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades terapéuticas

de la presente invención, p.ej., variantes sAXL en solitario o con anticuerpos aislados contra GAS6 o sales, ésteres o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, o cualquier profármaco de los mismos. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente invención en combinación con otro agente citotóxico, p.ej., otro agente antitumoral. En otras realizaciones más, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades de la presente invención en combinación con otro excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otras realizaciones más, las entidades terapéuticas de la presente invención se administran por lo general como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, diversos componentes farmacéuticamente aceptables distintos (véase Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed. sup., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). La forma preferente depende del modo de administración y la aplicación terapéutica pretendidos. La composición también puede incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que se definen como los vehículos comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para administración a seres humanos y animales. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Entre los ejemplos de dichos diluyentes se incluyen agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Asimismo, la composición farmacéutica o formulación puede incluir también otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes no inmunogénicos, no terapéuticos y no tóxicos, y similares.

En otras realizaciones más, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir también macromoléculas grandes de lenta metabolización como proteínas, polisacáridos, como quitosano, poliácidos lácticos, poliácidos glicólicos y copolímeros (como Sefarosa™ funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y agregados de lípidos (como gotas o liposomas de aceite). Asimismo, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir adyuvantes).

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, los polipéptidos variantes de AXL soluble definidos en la reivindicación 1 se utilizan en métodos para el tratamiento, reducción o prevención de metástasis tumoral o invasión tumoral inhibiendo la ruta de señalización de AXL y/o la ruta de señalización de GAS6. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención incluyen la inhibición de la actividad de AXL, la actividad de GAS6, o la interacción entre AXL y GAS6. Por ejemplo, la actividad de AXL o GAS6 se puede inhibir al nivel de expresión génica, al nivel de tratamiento de ARNm, a nivel de traducción, a nivel de post-traducción, a nivel de activación de proteína, etc. En otros ejemplos, la actividad de AXL o GAS6 se puede inhibir mediante moléculas pequeñas, moléculas biológicas, p.ej., polipéptidos, polinucleótidos, anticuerpos, conjugados anticuerpo-fármaco, etc. En otros ejemplos, se puede inhibir la actividad de AXL o GAS6 mediante una o más variantes sAXL o anticuerpos aislados de la presente invención.

Estos usos incluyen la administración a un sujeto que necesita tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis eficaz de una entidad terapéutica de la presente invención, p.ej., un inhibidor de la actividad de AXL o la actividad de GAS6 o un inhibidor de la interacción entre AXL y GAS6. En algunas realizaciones, las dosis eficaces de la entidad terapéutica de la presente invención, p.ej., para el tratamiento de cáncer metastásico, descritas en el presente documento varían dependiendo de diferentes factores, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, si bien es posible tratar a mamíferos no humanos, incluyendo mamíferos transgénicos. Es necesario ajustar la dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia.

En algunas realizaciones, la posología puede estar comprendida entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más normalmente entre 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, la posología puede estar comprendida entre 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro de intervalo de 1-10 mg/kg. Un ejemplo de régimen tratamiento implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez al trimestre o cada seis meses. Las entidades terapéuticas de la presente invención se administran normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre una y otra dosis pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según lo indiquen las mediciones de los niveles en la sangre del paciente de la entidad terapéutica. Alternativamente, las entidades terapéuticas de la presente invención se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La posología y la frecuencia variarán dependiendo del ciclo de vida del polipéptido en el paciente.

En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un período de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, a veces es necesario una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta reducir o poner fin al avance de la enfermedad y, preferentemente, hasta que el paciente presenta una mejora de los síntomas de la enfermedad parcial o completa. A continuación, se puede seguir un régimen de administración profiláctico para el paciente.

En otras realizaciones más, son usos de la presente invención métodos de tratamiento, reducción o prevención de metástasis tumoral o invasión tumoral de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado,

cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de próstata y/o glioblastoma.

En otras realizaciones más, las aplicaciones profilácticas, composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible o que está en riesgo de otra forma de contraer una enfermedad o una afección en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

En otras realizaciones más, para aplicaciones terapéuticas, se administran entidades terapéuticas de la presente invención a un paciente sospechoso de sufrir o que sufre dicha enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. La cantidad adecuada para llevar a cabo el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéutica o profilácticamente eficaz. Tanto en un régimen profiláctico como terapéutico, los agentes se administran normalmente con diversas posologías hasta haber conseguido una respuesta suficiente. Normalmente, se lleva un seguimiento de la respuesta y se administran dosis repetidas si existe recurrencia del cáncer.

De acuerdo con la presente invención, se pueden administrar las composiciones para el tratamiento de cáncer metastásico por medios parenterales, tópicos, intravenosos, intratumorales, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o musculares. La ruta de administración más habitual es la intravenosa o intratumoral si bien pueden ser igualmente eficaces otras rutas.

Para administración parenteral, se pueden administrar las composiciones de la invención como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Asimismo, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares como agentes de humectación o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tampón de pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas tienen un origen sintético, vegetal, animal o de petróleo, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, son preferentes glicoles como propilén glicol, o polietilén glicol como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los anticuerpos se pueden administrar en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante, que se puede formular para dar cabida a la liberación sostenida del principio activo. Un ejemplo de composición comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en un tampón acuoso que consiste en 50 mM L-histidina, 150 mM NaCl, ajustada a un pH 6,0 con HCl.

Normalmente, se preparan las composiciones como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. Asimismo, la preparación se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas como polilactida, poliglicolida o copolímero para potenciar el efecto adyuvante, tal como se ha explicado anteriormente. Langer, *Science* 249: 1527, 1990 y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97-119, 1997. Los agentes de la presente invención se pueden administrar en forma de inyección de liberación prolongada o preparación de implante formulada para dar cabida a una liberación sostenida o intermitente del principio activo.

Otras formulaciones adecuadas para los modos de administración incluyen formulaciones oral, intranasal y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

Para los supositorios, entre los aglutinantes y vehículos se incluyen por ejemplo polialquilen glicoles o triglicéridos; dichos supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferentemente, de 1 % a 2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen de 10 % a 95 % de principio activo, preferentemente, de 25 % a 70 %.

La aplicación tópica puede tener como resultado una entrega transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse con la administración conjunta del agente con una toxina del cólera o derivados desintoxicados o subunidades del mismo y otras toxinas bacterianas similares. Glenn et al., *Nature* 391: 851, 1998. La administración conjunta se puede conseguir utilizando los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

Alternativamente, la entrega transdérmica se puede conseguir utilizando un parche cutáneo o transferosomas Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25: 3521-24, 1995; Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368: 201-15, 1998.

Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como formulaciones estériles sustancialmente isotónicas y en plena conformidad con las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) reguladas por la Food and Drug Administration de Estados Unidos.

Preferentemente, una dosis eficaz de la composición de anticuerpo descrita en el presente documento proporcionará

un beneficio terapéutico sin causar una sustancial toxicidad.

La toxicidad de las proteínas descritas en el presente documento se puede determinar por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos de células o animales experimentales, p.ej., determinando la LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) o la LD<sub>100</sub> (la dosis letal para el 100 % de la población). La relación entre el efecto tóxico y el efecto terapéutico de la dosis es el índice terapéutico. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos con cultivos celulares y estudios animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosis que no sea tóxico para su uso en seres humanos. La dosis de las proteínas descritas en el presente documento se encuentra preferentemente en el intervalo de concentraciones en la circulación que incluyen la dosis eficaz con un mínimo de toxicidad o sin ella. La posología puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosis empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación, ruta de administración y posología exactas quedarán al criterio del médico en particular a la vista del estado del paciente. (Véase, p.ej., Fingl et al., 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1).

Se describen también kits que comprenden las composiciones (p.ej., variantes de AXL soluble y formulaciones de los mismos) de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional. Los kits incluyen normalmente una etiqueta en la que se indica el uso pretendido del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier signo escrito o material registrado suministrado sobre el kit o adjunto al kit de otra forma.

Se describen también métodos para determinar la capacidad de un tumor de invadir o y/o producir metástasis detectando y/o determinado el nivel de actividad de AXL o actividad de GAS6 en una muestra biológica de un sujeto de interés. En algunos casos, el nivel de actividad de AXL o actividad de GAS6 se mide por el nivel de expresión de ARNm, el nivel de expresión de proteína, el nivel de activación de proteína o cualquier indicador adecuado que corresponde a la actividad de AXL o GAS6 directa o indirectamente. En algunos casos, el nivel de actividad de AXL o actividad de GAS6 en una muestra biológica se compara además con un nivel predeterminado, p.ej., un nivel normal obtenido estableciendo niveles o intervalos normales de actividad de AXL o actividad de GAS6 sobre la base de una población de muestras de tumores que no desarrollan invasión tumoral o metástasis tumoral o de tejidos normales. Por ejemplo, un aumento de la actividad de AXL o la actividad de Gas6 por encima del nivel predeterminado o el nivel normal es indicativo de la predisposición del tumor de invasión tumoral o metástasis tumoral.

Todas las publicaciones y patentes que se citan en la presente memoria descriptiva son para divulgar y describir los métodos y/o materiales en conexión con la materia por la que se los cita. La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de registro y no deberá interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de la invención anterior. Asimismo, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden estar pendientes de confirmación de forma independiente.

Cualquiera de los métodos citados se puede llevar a cabo en el orden de eventos recitado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible. Los ejemplos que se ofrecen a continuación servirán para ilustrar las partes de la invención.

## Parte experimental

### Ejemplo 1

El bloqueo terapéutico de señalización de AXL inhibe la progresión metastásica de tumor

La demostración de AXL como diana terapéutica para enfermedad metastásica sigue inexplorada en gran medida y, es más, no se han demostrado correlatos de direccionamiento a AXL *in vivo*. Los inventores demuestran que AXL es un marcador de metástasis en pacientes humanos con cáncer de mama y de ovarios y que la gravedad de la enfermedad en estos pacientes está correlacionada con la cantidad de proteína AXL en el tumor primario. Cabe destacar sobre todo que los inventores han demostrado que la metástasis tumoral se puede tratar con éxito en ratones con metástasis preexistente por administración de ectodominios de AXL soluble. De manera mecánica, la inhibición de la señalización de AXL en animales con enfermedad metastásica tiene como resultado una disminución de la invasión con actividad de MMP. Los hallazgos de los inventores demuestran que la inhibición de la cascada de señalización de AXL en células tumorales a través de la administración de ectodominios de AXL soluble es suficiente para inhibir la progresión tumoral metastásica.

En este estudio, los inventores han determinado por ensayo si AXL es un factor crítico para la metástasis de cáncer humano y que el bloqueo terapéutico de la señalización de AXL puede constituir un tratamiento eficaz para enfermedad metastásica. Han utilizado enfoques tanto genéticos como terapéuticos para evaluar directamente el papel de AXL en el inicio y progresión de cáncer de mama y de ovario metastásico.

AXL es un marcador de la progresión tumoral y metástasis en cáncer humano. Los inventores han comprado la

expresión de AXL en tejido normal, tumor primario y metástasis de pacientes con cáncer de mama y de ovario. En el 100 % de las muestras de ensayo de cáncer de mama adyacente normal, las células epiteliales mamarias presentaron tinción nuclear y citoplásmica difusa para AXL que se consideró tinción de fondo dado que AXL es un receptor unido a membrana (n = 27, Figura 1 A). Sin embargo, en tumores de mama primarios, la tinción de AXL membranosa en epitelio tumoral estuvo presente en 25 % (1/4) de las muestras de ensayo de grado 1, 76% (10/13) de grado 2 y 100% (18/18) de grado 3 (Figura 1A y Tabla 1). Asimismo, AXL se expresó en 88% (8/9) de las metástasis de ganglio linfático.

En las muestras de ensayo de cáncer de ovario seroso, se examinó primero la expresión de AXL en el epitelio superficial del ovario (ESO) normal ya que se cree que la mayoría de los tumores de ovario surgen de estas células. En las muestras de ensayo de pacientes con cáncer de ovario que retuvieron ESO normales, AXL se expresó en 0% de las muestras de ensayo (0/5) (Figura 1 B). En cambio, la tinción de AXL membranoso en epitelio de tumor primario estuvo presente en 66 % (6/9) de las muestras de paciente de estadio II y 83% (53/64) de estadio III (Figura 1B y Tabla I). Por otra parte, las muestras de tumor de sitios metastásicos comunes como el omento y el peritoneo presentaron una alta expresión de AXL en 75 % (24/32) y 90% (27/30) de las muestras de ensayo respectivamente (Figura 1B y Tabla I). Estos hallazgos demuestran que la expresión de AXL dentro de tumores primarios está correlacionada con la metástasis tal como se muestra en la enfermedad avanzada y tumores metastásicos. Asimismo, estos datos demuestran que las metástasis derivadas de cánceres de mama y de ovario expresan altos niveles de AXL.

AXL es un factor crítico para metástasis tumoral. Para examinar el papel funcional de AXL en la metástasis, los inventores utilizaron un enfoque genético para inhibir AXL en modelos de ratón de metástasis de mama y de ovario. Para este fin, rastrearon un panel de líneas celulares de cáncer de mama y de ovario humanas para determinar la expresión de proteína AXL con el propósito de identificar las líneas celulares metastásicas con altos niveles de expresión de AXL. De manera similar a los hallazgos clínicos de los inventores, AXL se expresó altamente en la mayoría de las líneas celulares metastásicas de cáncer de mama (NCI-ADR-RES, MDA-231, HS 578T, BT-549) y de ovario (SKOV3, OVCAR-8, ES-2, MESOV, HEYA8), mientras que AXL se expresó a niveles indetectables o bajos en líneas celulares con un bajo potencial metastásico (MCF7, MDAMB435, T47D, IGROV1, OVCAR-3; Figura 9). Se generaron líneas celulares metastásicas de cáncer de mama (MDA-231) y ovario (MDA-231) AXL deficientes utilizando las secuencias de direccionamiento AXL shARN antes descritas. El análisis de transferencia de Western confirmó que las células que expresaban secuencias de direccionamiento shAXL expresaban menos de un 5 % de proteína AXL en comparación con las células que expresaban la secuencia de direccionamiento de shARN de control desordenada (shSCRM, Figura 9B).

Para evaluar directamente el papel de AXL en los últimos estadios de metástasis de tumor de mama, inyectaron células AXL-tipo silvestre (shSCRM) y MDA-231 (shAXL) AXL deficientes en la vena caudal de ratones desnudos y evaluaron la carga tumoral en los pulmones el día veintiocho. La evaluación microscópica de los pulmones reveló que 5/5 ratones inyectados con células MDA-231 de secuencia desordenada (shSCRM) shARN desarrollaron focos metastásicos que tiñeron positivo para AXL (Figura 2A). En cambio, 0/5 ratones inyectados con AXL shARN (shAXL) desarrollaron metástasis de pulmón tras la evaluación histológica (Figura 2A). Para determinar cuantitativamente la carga tumoral en los pulmones de estos ratones, llevaron a cabo un análisis de PCR en tiempo real para GAPDH humana. La Figura 2A demuestra que los pulmones de los ratones a los que se les inyectó células MDA-231 shSCRM expresaron altos niveles de GAPDH humana lo que indica la presencia de lesiones metastásicas derivadas de células MDA-231. Asimismo, los ratones a los que se les inyectó shSCRM expresaron AXL humano en los pulmones lo que indica la presencia de células tumorales AXL positivas (Figura 2A). En cambio, los ratones a los que se les inyectó células tumorales shAXL no expresaron GAPDH humana ni AXL en el pulmón. Estos hallazgos demuestran que la inactivación genética de AXL es suficiente para suprimir completamente la formación de metástasis de tumor en este modelo.

Para determinar si la inactivación genética de AXL afecta a la capacidad de las células de cáncer de ovario a metastatizar *in vivo*, compararon la capacidad de células SKOV3ip.1 shSCRM y shAXL de formar metástasis utilizando un modelo de xenoinjerto peritoneal de cáncer de ovario. Este modelo recapitula la diseminación peritoneal de metástasis de ovario humano en la que los ratones desarrollan rápidamente enfermedad progresiva que consiste en ascitis y más de 100 lesiones metastásicas pequeñas unidas al mesenterio, el diafragma, el hígado y otras superficies peritoneales tras inyección peritoneal de células SKOV3ip.1 (Figura 3B). El análisis inmunohistoquímico de la expresión de AXL en metástasis peritoneal SKOV3ip.1 reveló que al igual que en las metástasis de ovario humanas, AXL está altamente expresado en lesiones metastásicas SKOV3ip.1 lo que indica que es un sistema de modelo pertinente para investigar el papel de AXL en metástasis de ovario (no se muestran los datos). Veintiocho días después de la inyección peritoneal de células shSCRM y shAXL, los ratones shSCRM desplegaron signos de ascitis severa y morbilidad que obligaron a los inventores a sacrificar a los ratones e investigar los cambios en la carga tumoral entre los ratones inyectados con shSCRM y shAXL. Mientras que los ratones a los que se les inyectó células shSCRM desarrollaron ascitis y >100 metástasis peritoneal, los ratones a los que se les inyectó shAXL desarrollaron muchas menos metástasis (Figura 2B). El número medio de metástasis peritoneales de más de 5 mm de tamaño se redujo significativamente de 13,4+/- 4,3 en los ratones a los que se les inyectó shSCRM a 0,8+/- 0,5 en los ratones a los que se les inyectó shAXL (Figura 2B). De manera similar, el peso medio de estos tumores se redujo significativamente de 236 +/- 74 mg en los ratones a los que se les inyectó shSCRM a 39,2 +/-18 mg en los

ratones a los que se les inyectó shAXL (Figura 2B). Como corroboración de estos hallazgos, la desactivación de expresión de AXL en células OVCAR-8 inhibió significativamente la masa tumoral peritoneal ovárica y el número de tumores (Figura 2C). En conjunto, estos hallazgos demuestran que AXL es un factor crítico para la metástasis de tumor de mama y ovario.

5 Dado el importante papel de AXL en la formación de metástasis *in vivo*, a continuación, los inventores trataron de determinar si AXL regula específicamente la metástasis o si AXL desempeña un papel general en la regulación de la proliferación y crecimiento de célula tumoral. Para abordar estas cuestiones, realizaron ensayos de proliferación *in vitro* en los que se hizo un recuento del número total de células entre células AXL de tipo silvestre (shSCRM) y AXL deficientes (shAXL) a lo largo de un período de 10-14 días. Observaron que no había una diferencia significativa en las curvas de crecimiento celular entre células MDA-231, SKOV3ip.1 o OVCAR-8 shSCRM y shAXL (Figura 3). De manera similar, no se observó ninguna diferencia significativa entre el crecimiento de tumor MDA-231 ortópico y SKOV3ip.1 subcutáneo entre células shSCRM y shAXL (Figura 3). Estos hallazgos indican que AXL no es necesario en el crecimiento subcutáneo y la proliferación de célula tumoral *in vivo*. En general, los hallazgos de los inventores indican que AXL regula específicamente la metástasis de tumor en tumores de mama y de ovario.

20 AXL regula la invasión de célula tumoral. Para determinar un mecanismo potencial para la metástasis mediada por AXL, los inventores adoptaron un enfoque imparcial y compararon directamente el papel de AXL en las funciones celulares críticas asociadas con la cascada metastásica incluyendo proliferación, invasión, migración, adhesión y supervivencia. Observaron que se había dañado significativamente la capacidad de las células MDA-231, SKOV3ip.1 y OVCAR-8 shAXL, de invadir a través de colágeno tipo I (Figura 4 A). Asimismo, observaron un modesto descenso de la migración celular en células shAXL, si bien no pudieron encontrar ninguna diferencia en la adhesión a proteínas ECM o supervivencia tras la retirada de suero lo que indica que AXL afecta predominantemente a la invasión de la cascada metastásica.

25 A nivel molecular, se ha identificado recientemente la MMP-9 como un efector de la invasión mediada por AXL en células de cáncer de mama. Por lo tanto, los inventores investigaron si la actividad o expresión de MMP-9 se alteraba en células de tumor de ovarios AXL deficientes. Si bien las células SKOV3ip.1 no expresaron MMP-9, observaron que MMP-2 se expresaba altamente en estas células y ARNm de MMP-2 disminuía significativamente en células shAXL (Figura 4B). Los ensayos de indicador luciferasa de MMP-2 revelaron que la actividad del promotor MMP-2 descendía significativamente en células shAXL en comparación con células shSCRM lo que indica que AXL regula MMP-2 a nivel transcripcional (Figura 4C). Los ensayos de zimografía en gelatina indicaron que los niveles de proteína secretada por MMP-2 también se redujeron significativamente en células shAXL en comparación con células SKOV3ip.1 shSCRM (Figura 4D). En conjunto, estos hallazgos sugieren el papel regulador de AXL en dirección 5' en la expresión y actividad de MMP-2 en células de cáncer de ovario humano.

40 A continuación, los inventores trataron de elucidar las rutas de señalización relacionadas con la expresión de MMP-2 mediada por AXL. Se ha señalado que la activación de AXL mediante GAS6 induce directamente una serie de rutas de señalización intracelulares, incluyendo PI3K, RAS, MAPK, SRC y PLC. Entre estas rutas, se ha demostrado que la ruta de señalización PI3K regula la expresión de MMP-2 y la invasión en células de cáncer de ovario. Para determinar si la señalización de PI3K es afectada por la pérdida de AXL en células SKOV3ip.1, los inventores realizaron análisis de transferencia western para fosfo-AKT en Ser473 (P-AKT) en células SKOV3ip.1 AXL-tipo silvestre y AXL-deficientes. Observaron una profunda inhibición de la expresión P-AKT en células shAXL en comparación con células SKOV3ip.1 shSCRM (Figura 4E). Asimismo, la estimulación con GAS6 de células SKOV3ip.1 privadas tuvo como resultado una inducción de P-AKT dependiente de PI3K ya que el tratamiento con el inhibidor PI3K Ly294002 anuló completamente la expresión de P-AKT inducida por GAS6 (Figura 4E). Para determinar si la ruta PI3K está relacionada con la expresión de MMP-2 mediada por AXL, los inventores realizaron ensayos de indicador luciferasa de MMP-2 en presencia de GAS6 y Ly294002. La inducción de la actividad de promotor de MMP-2 seguido de estimulación con GAS6 fue completamente bloqueada con el tratamiento con Ly294002 lo que indica que la señalización de GAS6/AXL regula la expresión de MMP-2 a través de episodios de señalización PI3K (Figura 4F).

55 La inhibición terapéutica de AXL suprime significativamente la progresión tumoral metastásica en ratones. Los hallazgos de los inventores han demostrado hasta ahora que AXL es un factor crítico para la metástasis y corroboran la hipótesis de que un bloqueo terapéutico puede ser un tratamiento eficaz contra enfermedad metastásica. Para comprobar por ensayo dicha hipótesis, utilizaron el ectodominio de AXL soluble como estrategia terapéutica para inhibir la señalización de AXL. La funcionalidad de ectodominio de AXL soluble actúa como receptor señuelo y se ha demostrado previamente que se une a GAS6 con afinidad nanomolar *in vitro* e *in vivo* (Figura 5A). En primer lugar, los inventores examinaron si el tratamiento con ectodominios AXL soluble es suficiente para inhibir señalización de AXL e invasión en células tumorales metastásicas. AXL regula la señalización PI3K/AKT en diversos tipos de células. Los inventores observaron que la señalización de PI3K/AKT está regulada por la señalización GAS6/AXL en células SKOV3ip.1 y el tratamiento con ectodominios de AXL soluble (sAXL) fue capaz de reducir la activación PI3K/AKT en células SKOV3ip.1 tratadas con GAS6 (Figura 5B y C). De manera similar, el tratamiento de células MDA-231 en colágeno con sAXL fue suficiente para reducir de forma espectacular la invasión celular, lo que demuestra que el tratamiento con sAXL afecta a la señalización de AXL y la invasión *in vitro* (figura 5D).

Los inventores examinaron a continuación si el tratamiento con sAXL afectaría a la progresión de tumor metastásica en los modelos altamente metastásicos de cáncer de ovario. En primer lugar, establecieron lesiones metastásicas con SKOV3ip.1 en ratones desnudos (día 1) y comenzaron el tratamiento con sAXL el día 7 una vez verificadas las lesiones macroscópicas. Se entregó la terapia con sAXL utilizando un sistema adenoviral en el que el hígado libera la producción sistémica de proteína sAXL en el suero de ratones durante hasta 28 días tras la inyección (Figura 6A). El análisis macroscópico de la carga tumoral el día 28 reveló que los ratones que recibieron la terapia con sAXL presentaban una significativa reducción ( $p < 0,01$ ) en la carga tumoral en comparación con los ratones tratados con la terapia de control Fc. En el modelo de tumor SKOV3ip.1, el peso total del tumor y el número de tumores disminuyó en un 63 % en los ratones tratados con sAXL en comparación con los ratones tratados con Fc (Figura 6B). De manera similar, en el modelo OVCAR-8, el peso total de tumor y el número de tumores disminuyó significativamente en un 47 % y un 42 %, respectivamente (Figura 11). Los inventores examinaron los niveles de expresión de MMP-2 en tumores SKOV3ip.1 por análisis de PCR en tiempo real y observaron que los niveles de MMP-2 habían disminuido significativamente en los tumores de los ratones tratados con sAXL en comparación con los ratones tratados con control Fc (Figura 6C). Estos resultados demuestran que la terapia con AXL como único agente es suficiente para reducir significativamente la carga tumoral metastásica en ratones con enfermedad establecida. Por otra parte, los hallazgos de los inventores indican que el efecto terapéutico de AXL en el crecimiento de tumor metastásico puede implicar la inhibición de la invasión al menos en parte a través de la regulación de la actividad de MMP.

Dado que se ha demostrado que los inhibidores anti-metastásicos anteriores que se dirigen a MMP tienen un significativo efecto sobre la toxicidad del tejido normal, los inventores realizaron un exhaustivo análisis de la toxicidad sobre el tejido normal en ratones tratados con terapia con sAXL durante 21 días. No observaron ninguna anomalía conductual, macroscópica o microscópica en los ratones desnudos tratados con terapia con sAXL o Fc (Figura 7).

La invasión y migración son importantes propiedades intrínsecas de la célula que contribuyen a la patogénesis de metástasis de tumor. Se ha lanzado la hipótesis de que los agentes terapéuticos que se dirigen a estos procesos pueden constituir una útil estrategia para inhibir la metástasis y pueden proporcionar beneficios clínicos a pacientes con enfermedad metastásica. En este informe, los inventores demuestran que el receptor tirosina quinasa AXL es un factor crítico que rige la invasión celular tumoral y la metástasis. Cabe destacar sobre todo que los inventores demuestran que el bloqueo terapéutico de la señalización de AXL utilizando receptores AXL soluble es suficiente para inhibir significativamente la progresión tumoral metastásica en ratones con enfermedad metastásica preexistente. A nivel mecánico, los estudios realizados indican que la terapia con AXL soluble inhibe la metástasis de tumor al menos en parte a través de la inhibición de la actividad de MMP y la invasión. Finalmente, los inventores han demostrado que AXL se expresa altamente en metástasis y tumores primarios en un estadio avanzado de pacientes humanos con cáncer de ovario y de mama lo que pone de relieve la importancia clínica de sus hallazgos.

Se demuestra en el presente documento que AXL es un factor crítico para la metástasis en cáncer humano y que el bloqueo terapéutico de la señalización de AXL es un tratamiento eficaz para enfermedad metastásica. En este punto, los inventores han demostrado que AXL está altamente expresado en muestras de tumores primarios avanzados y metástasis de pacientes con cáncer de mama y ovario. Han demostrado genéticamente que AXL es crítico para el inicio del cáncer de mama y ovario metastásico utilizando modelos de ratones desnudos con la enfermedad. Cabe destacar sobre todo que los inventores han desarrollado receptores AXL soluble no tóxicos y altamente específicos como terapia anti-AXL y han demostrado que la terapia con receptor AXL soluble es suficiente para inhibir significativamente la progresión de tumor metastásico en ratones con enfermedad metastásica preexistente. Los hallazgos de los inventores demuestran que la inhibición de la cascada de señalización de AXL en células tumorales puede bloquear tanto la iniciación como la progresión de la enfermedad metastásica. De los datos de los inventores se deduce que AXL es una nueva diana terapéutica para cáncer de mama y de ovario avanzado y metastásico e indican que la terapia anti-XL puede controlar tanto el inicio como la progresión de enfermedad metastásica.

MMPs desempeña un importante papel en la regulación de la invasión de célula tumoral y metástasis. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales las células tumorales inducen actividad de MMP siguen sin estar claras. La expresión de MMP aumenta en cáncer humano y está correlacionada con la progresión de tumor y la escasa supervivencia del paciente. Por lo general, raramente se encuentran amplificaciones genéticas y mutaciones de activación en las MMP en cáncer humano, lo que indica que hay otros factores responsables de la potenciación de la expresión de MMP en cáncer. Los datos de los inventores proporcionan evidencia de que la expresión de MMP-2 está regulada por AXL a nivel transcripcional en células de cáncer de ovario humano. Si bien queda por determinarse los mecanismos exactos a través de los cuales AXL regula la expresión de MMP-2, los inventores han demostrado que la inhibición farmacológica de la ruta de PI3K reduce la actividad de promotor MMP-2 en células estimuladas con GAS6, lo que indica un papel de la ruta de PI3K (Figura 8). Cabe destacar que los resultados obtenidos por los inventores indican que el bloqueo terapéutico de AXL puede ser una estrategia eficaz y no tóxica para inhibir la actividad de MMP en tumores. Los inhibidores de MMP de amplio espectro han fracasado en las pruebas contra el cáncer en parte debido a los altos niveles de toxicidad sobre el tejido normal. Los hallazgos de los inventores indican que los efectos secundarios que se puedan predecir para la terapia anti-AXL son mínimos. No observaron toxicidad alguna sobre el tejido normal asociada con la entrega mediada por adenovirus de la terapia de

ectodominio de AXL soluble en ratones. Asimismo, los ratones con desactivación de GAS6 y línea germinal AXL fueron viables y fenotípicamente normales como adultos lo que indica que AXL o GAS6 no se necesitan para el desarrollo o la función del tejido normal.

5 Los inventores han demostrado que la terapia con AXL como único agente es suficiente para inhibir la progresión de tumor metastásico en modelos altamente metastásicos de cáncer de ovario metastásico. Estos hallazgos tienen importantes repercusiones clínicas para el tratamiento de cáncer de ovario. Aproximadamente 14.600 personas mueren al año por cáncer de ovario en Estados Unidos. Actualmente, no existen productos biológicos aprobados por la FDA para el tratamiento de cáncer de ovario, si bien están siendo estudiados en pruebas clínicas avastatin (mAb dirigido contra VEGF) y Tarceva (inhibidor quinasa de molécula EGFR) para el tratamiento de cáncer de ovarios avanzado y recurrente. La terapia convencional contra el cáncer de ovario incluye cirugía con citorreducción de la enfermedad seguido de terapia combinada con platino – taxano citotóxica. A pesar de estos esfuerzos, el ochenta por ciento de las pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario desarrollan enfermedad recurrente y únicamente un 30 % de dichos pacientes sobreviven 5 años tras el diagnóstico.

15 Según los datos de los inventores, la terapia con AXL es una terapia adyuvante eficaz para el tratamiento de cáncer de ovario avanzado y recurrente. El modelo de progresión de tumor ovárico metastásico utilizado en sus estudios se asemeja al desarrollo de enfermedad recurrente en pacientes humanos tras la citorreducción quirúrgica. Los inventores han observado que la terapia con AXL es capaz de reducir la carga tumoral metastásica en ratones con enfermedad establecida en un 63 %. El establecimiento de nuevas lesiones metastásicas durante la progresión de la enfermedad se redujo significativamente. Esta conclusión se ajusta a los hallazgos de los inventores que demuestran que AXL afecta predominantemente a la invasión de la célula tumoral más que a la proliferación o crecimiento celular. Tomados en conjunto los resultado obtenidos por los inventores indican que la terapia de AXL funciona principalmente como agente anti-metastásico y puede ser máximamente eficaz como terapia de combinación con agentes citotóxicos actuales.

20 En suma, AXL es un factor crítico para la metástasis y bloqueo de la señalización de AXL y tiene beneficios terapéuticos en metástasis. Estos estudios proporcionan datos pre-clínicos importantes para la terapia anti-AXL para combatir enfermedad metastásica.

### 30 **Métodos**

Se obtuvieron líneas celulares ováricas SKOV3, SKOV3ip.1, y HEYA8 como donación del Dr. Gordon Mills (MD Anderson Cancer Center). Las células ováricas ES-2 y MESOV fueron donación del Dr. Branimir Sikic (Universidad de Stanford). Las células MDA-231, OVCAR-3, y MCF-7 fueron adquiridas de ATCC. Las células IGROV-1 y OVCAR-8 fueron adquiridas del repositorio de líneas celulares de tumor DCTD NCL-Frederick. Se cultivaron las células en un medio apropiado suplementado con suero de bovino fetal inactivado por calor al 10 % y 1 % penicilina y estreptomycin a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %. El sedimento celular del panel NCI60 de líneas celulares de cáncer de ovario y de mama fue proporcionado por el Dr. Giovanni Melillo (NCI-Frederick).

40 Pacientes y micromatrices de tejido. Se adquirieron micromatrices de tejido de mama humano de US Biomax (BR1002). Se obtuvieron micromatrices de tejido de ovario humano del Departamento de patología de la Universidad de Stanford. Se obtuvo un total de 73 muestras de tumor embebidas en parafina de pacientes de cáncer de ovario sin tratar previamente en el Hospital de Stanford desde 1995 a 2001. Estas muestras de tumor de ovario primario fueron ensambladas en una micromatriz de tejido que consistió en dos muestras por paciente. Se evaluaron también otras 30 muestras de tumor más del peritoneo en esta micromatriz. Todas las pacientes tenían cáncer de ovario seroso y se obtuvo información sobre la estadificación de acuerdo con los criterios de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia. Se recogieron todas las muestras de ensayo y la información clínica correspondiente con arreglo a los protocolos aprobados por el consejo de revisión institucional de la Universidad de Standford. Se utilizó una micromatriz de tumor disponible en el mercado adicional para examinar 32 lesiones metastásicas del omento (US Biomax).

55 Inmunohistoquímica de AXL. Se desparafinaron los portaobjetos con tejido embebido en parafina con xileno, se rehidrataron y se desenmascararon seguido de métodos inmunohistoquímicos convencionales. Se utilizó el anticuerpo primario AXL (RandD Systems) a una dilución 1:500. Se realizaron controles negativos para todas las muestras utilizando un anticuerpo secundario en solitario. Se visualizaron los complejos antígeno-anticuerpo utilizando el sistema VECTASTAIN ABC (Vector Laboratories) y el kit sustrato DAB para Peroxidasa (Vector Laboratories) siguiendo los protocolos del fabricante. Se contratiñeron los portaobjetos con hematoxilina. Se puntuó la tinción de AXL sobre la membrana de las células tumorales microscópicamente según el porcentaje de células positivas para la expresión de AXL (0 para ausencia, 1 para muestra de mala calidad, 2 para 5-60 % y 3 para 61-100%).

65 Ensayos de indicador. El plásmido indicador de MMP-2 activado por 1659 pb del promotor de MMP-2 fue una donación. Se determinó la actividad de luciferasa por reactivo de Ensayo Luciferasa Dual-Glo (Promega) en células SKOV3ip.1 shSCRM y shAXL y se midió en un Luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory). Se normalizó la actividad de luciferasa Firefly en actividad Renilla. Se realizaron los ensayos por triplicado y se

repetieron dos veces.

Transfecciones transitorias y retroviral. Se realizaron transfecciones de ADN transitorias con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transfectó 0,1 mg de ADNc MMP-2 (OpenBiosystems) en un plato de 6 pocillos.

siARN: las secuencias de siARN dirigidas a AXL o el control fueron adquiridas de Dharmacon. Todas las transfecciones de siARN fueron realizadas utilizando Dharmacon Smart Pools con reactivo de transfección Dharmafect 1 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dharmacon, Lafayette, CO).

shARN: Se sintetizaron oligos para la degradación específica de ARN AXL 5'-GATTTGGAGAACACACTGA-3' tal como se ha descrito anteriormente. Se utilizó una secuencia desordenada (scramble) como shARN sin direccionamiento 5'-AATTGTACTACACAAAAGTAC-3'. Se clonaron estos oligos en el vector RNAi-Ready pSiren RetroQ (BD Bioscience) y se transdujeron retroviralmente células SKOV3ip.1, MDA-231, y OVCAR-8 con estos vectores. Se seleccionaron células infectadas en puromicina (Sigma) y se sometieron a ensayo las poblaciones policlonales para determinar el descenso de los niveles de expresión de AXL por análisis de transferencia de western.

Plásmidos. Se amplificó el ectodominio de AXL correspondiente a los aminoácidos 1-451 desde ADNc de AXL humano (Open Biosystems) y se clonó en el vector lanzadera adenoviral pADD2 activado con CMV. Las transfecciones de ADN transitorias con vector control o AXL 1-451 fueron realizadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante en células HCT116. Se recogieron los medios acondicionados 48-72 horas después de la transfección.

Ensayos de adhesión. Se marcaron fluorescentemente células SKOV3ip.1 shSCRM y shAXL con 5µm CMFDA (Molecular Probes). Se lavaron las células y se desprendieron con tampón no enzimático de disociación celular (Gibco). Se colocaron las células (5X10<sup>5</sup>) en placas de 96 pocillos y se pre-revistieron con 50ug/ul de colágeno tipo I (BD Bioscience). Después de incubación durante 60 minutos a 37 °C, se lavaron las células cuidadosamente 5 veces. Se midió la actividad fluorescente (excitación, 494 nm; emisión, 517nm) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia.

Adhesión de SKOV3ip.1 a colágeno tipo I. Se marcaron fluorescentemente células SKOV3ip.1 shSCRM y shAXL con 5µm CMFDA (Molecular Probes). Se lavaron las células y se desprendieron utilizando un tampón no enzimático de disociación (Gibco). Se colocaron células (5X10<sup>5</sup>) por triplicado en una placa de 96 pocillos y se pre-revistieron con 50ug/ul de colágeno tipo I (BD Bioscience). Al cabo de 60 minutos de incubación a 37 °C, se lavaron cuidadosamente las células 5 veces. Se midió la actividad fluorescente (excitación, 494 nm; emisión, 517nm) utilizando un espectrofotómetro fluorescente.

Adhesión de MDA-231 a proteínas ECM Proteínas. Se colocaron en placa células MDA-231 shSCRM y shAXL (0,5x10<sup>6</sup>) por triplicado en pocillos que contenían una matriz de proteínas ECM incluyendo laminina, colágeno I y IV, fibronectina y fibrinógeno. Se incubaron las células a 37 °C durante 1 h y se lavaron en PBS. Se tiñeron las células adherentes y se cuantificaron a DO de 560 de acuerdo con el protocolo del fabricante (CellBiolabs).

Ensayos de migración. Se examinó la migración celular *in vitro* tal como se ha descrito anteriormente. Brevemente, se privaron de suero las células durante 24 horas y se sembraron (2,5 x 10<sup>4</sup> células) por triplicado en insertos sin revestir (BD Biosciences), se trasladaron a cámaras que contenían FBS como quimioatrayente y se incubaron durante 24 horas. Después de separar las células no invasoras, se fijaron las células en la parte inferior de las membranas, se tiñeron y se contaron. Se contaron cinco campos para cada membrana. Se determinó el % de migración del siguiente modo: (Nº medio de células que migraron en células shAXL/Nº medio de células que migraron en células shSCRM) x 100. Se realizaron los experimentos por triplicado y se repitieron tres veces.

Ensayo de invasión de colágeno. Se realizaron ensayos de invasión de colágeno tal como se ha descrito anteriormente. Brevemente, se colocaron 533 células en colágeno tipo I sobre una placa de 48 pocillos. Se cultivaron las células en medios normales o en medios con la adición de medios de control acondicionado o medios acondicionados con sAXL durante 5-7 días y se tomaron fotografías. Se cuantificó la invasión a través de colágeno calculando el porcentaje de células tumorales que desplegaban un fenotipo ramificado por campo 20X. Se hizo el recuento de tres campos por muestra. Se llevaron a cabo los experimentos por triplicado y se repitieron 2 veces.

Zimografía en sustrato de gelatina. Se privaron de suero células SKOV3ip.1 shSCRM y shAXL durante 48 horas. Se colocaron 25.000 células en una placa de 96 pocillos y se recogieron los medios acondicionados 24 horas después. Se pusieron en marcha volúmenes iguales de medios acondicionados en condiciones no reductoras de geles de zimograma al 10 % (Invitrogen). Tras la electroforesis, se lavaron los geles en 2,5 % (v/v) Triton X-100 para eliminar SDS y se lavaron en 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, y 0,1% Triton X-100 (pH 7,8) y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se tiñeron los zimogramas durante 30 min con 0,25% (p/v) de azul R250 brillante de Coomassie disuelto en 40 % de metanol y 10 % de ácido acético glacial. Se destiñeron los geles en 40 % de metanol y 10 % de ácido acético glacial. Se realizaron los experimentos por duplicado y se repitieron tres veces.

Ensayos de proliferación celular. Para las curvas de crecimiento de monocapa, se colocaron en placa células (50.000) en platos de 60 mm por triplicado. Cada tres días, se tripsinizaron las células, se contaron utilizando un contador de células (contador Coulter) y se volvieron a colocar en placa 50.000 y se volvieron a contar.

5 Ensayo de supervivencia con XXT. Se midió la viabilidad celular mediante ensayo con XTT tal como se ha descrito anteriormente. Brevemente, se incubaron células privadas o alimentadas con suero (0, 3, 6, y 7 días) con medio sin rojo fenol con 0,3 mg/ml de XTT y 2,65 µg/ml *N*-metil dibenzopiracín metil sulfato. Se retornaron las placas de 96 pocillos a la incubadora a 37°C durante 1 a 2 h. Se cuantificó el metabolismo de XTT midiendo la absorbancia a 450 nm.

10 Aislamiento de proteína y análisis de transferencia western. Se recogieron lisados de proteína en 9M Urea, 0,075 M tampón Tris (pH 7,6). Se cuantificaron lisados de proteína utilizando el ensayo Bradford y se sometieron a SDS-PAGE de reducción utilizando métodos convencionales. Se sondearon las manchas de transferencia de western con anticuerpos contra AXL (RandD Systems), alfa Tubulina (Fitzgerald Antibodies), AKT (Cell Signaling), fosfo-AKT (Cell Signaling).

15 Para la estimulación con GAS6, se privaron de suero las células durante 24 horas. A continuación, se trataron las células con 25 µM de inhibidor PI3K (Ly294002, Bio Mol Research Laboratory) o 100 I de medios acondicionados que contenían el dominio Ecto de AXL durante 4 horas antes del tratamiento con 400 ng/ml de GAS6 durante 15 minutos.

20 Para el análisis de la expresión de sAXL en el suero de ratones, se analizaron 1,5 l de suero de cada muestra por electroforesis en gel.

25 Generación y producción de adenovirus. Se amplificó el ectodominio de AXL correspondiente a los aminoácidos 1-451 desde ADNc AXL (Open Biosystems) y se clonó en la región E1 de la cepa 5 E1-E3- Ad por recombinación homóloga seguido de la producción de adenovirus en células 293 y purificación de gradiente CsCl tal como se ha descrito anteriormente. La producción y purificación de adenovirus sAXL fue llevada a cabo tal como se ha descrito anteriormente. La generación y producción del virus de control negativo que expresa fragmento de inmunoglobulina IgG2-Fc murino han sido descritas con anterioridad.

30 Crecimiento de células SKOV3ip.1 y OVCAR-8 como xenoinjertos peritoneales. Todos los procedimientos que implicaron animales y su cuidado fueron aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Stanford de acuerdo con las directrices de los NIH e institucionales.

35 Se inyectaron células SKOV3ip.1 y OVCAR-8 de control y AXL i.p.,  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  células respectivamente, en 0,5 ml de PBS en ratones desnudos hembra. Después de sacrificarlos, se cuantificó el grado de ascitis, se hizo el recuento de lesiones metastásicas y se diseccionaron todas las lesiones visibles y se extirparon para calibrar el peso del tumor.

40 Se inyectaron i.p. células parentales SKOV3ip.1 y OVCAR-8,  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  células respectivamente, en 0,5 ml de PBS en ratones desnudos hembra. Siete días (SKOV3ip.1) o 14 días (OVCAR-8) después de la inyección de células tumorales, se les inyectó a los ratones  $1,9 \times 10^8$  ufp adenoviral con sAXL o control en 0,1 ml PBS en la vena caudal. Tras el sacrificio, se cuantificó el grado de ascitis, se hizo el recuento de lesiones metastásicas y se diseccionaron todas las lesiones visibles y se extirparon para calibrar el peso del tumor.

45 Estudios de toxicidad de tumor. Se inyectaron i.p. células parentales SKOV3ip.1,  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  células respectivamente, en 0,5 ml de PBS en ratones desnudos hembra. Siete días después de la inyección de células tumorales, se les inyectó a los ratones  $1,9 \times 10^8$  ufp adenovirales sAXL o control en 0,1 ml PBS en la vena caudal. El día 28, se sacrificó a los ratones. Se recogió sangre y el Departamento de Medicina Comparativa de la Universidad de Stanford realizó un análisis CBC y de panel metabólico completo. Se recogieron muestras de tejido de todos los órganos principales, incluyendo el hígado, el riñón, el cerebro y el bazo; se fijaron en 10 % de formalina, se embebieron en parafina, se seccionaron y se hizo el recuento con tinción con hematoxilina y eosina.

50 Ensayo de Metástasis en vena caudal *in vivo*. Se inyectaron células MDA-231 de control y AXL shARN por vía intravenosa,  $5 \times 10^5$  células, en 0,1 ml de PBS en la vena caudal de ratones desnudos. Cuatro semanas tras la inyección, se sacrificó a los ratones. Se realizó la evaluación microscópica de los focos de tumor sobre secciones transversales representativas de pulmón, embebidas en parafina y fijadas con formalina, teñidas con hematoxilina y eosina. Un consejo de patólogos acreditados confirmó la correcta identificación de los focos de tumor con un mínimo de cuatro células humanas con núcleos grandes y positivos para expresión de AXL. Se cuantificó la carga tumoral en los pulmones de los ratones por análisis de PCR en tiempo real de expresión de GAPDH humana y AXL en ARN aislado de pulmón completo.

55 Crecimiento de células MDA-231 como tumores ortotópicos. Se cultivaron células MDA-231 como tumores ortópicos subcutáneos en ratones desnudos hembra de seis semanas de vida (*nu/nu*) tras inyección intradérmica de  $10^7$  células en 0,1 ml de PBS en la almohadilla grasa mamaria. Se midieron los tumores con calibradores durante el

transcurso de 38 días. Se calculó el volumen aplicando la siguiente fórmula anchura<sup>2</sup> x longitud x 0,5.

Crecimiento de células SKOV3ip.1 como tumores subcutáneos. Se implantaron cinco millones de células en 0,1 ml de PBS por vía subcutánea en los flancos de ratones hembra desnudos (*nu/nu*) de seis semanas de vida. Se midieron los tumores con calibradores durante el transcurso de 45 días. Se calculó el volumen utilizando la fórmula anchura<sup>2</sup> x longitud x 0,5.

Análisis de PCR en tiempo real y ARN. Se aisló ARN de células y tejidos utilizando triazol de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen). Se sintetizó ADNc de 2 µg de ARN tratado con ADNasa (Invitrogen) utilizando el sistema de síntesis de primera cadena para PCR de transcripción inversa Super-Script (Invitrogen). Se sometió a amplificación por PCR un microlitro de ADN utilizando SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems). Se utilizaron los siguientes grupos de cebador para amplificar los genes diana específicos: 18S directa: 5-GCCCGAAGCGTTTACTTTGA-3 inversa: 5-TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC-3; AXL directa: 5-GTGGGCAACCCAGGGAATATC-3 inversa: 5-GTACTGTCCCGTGTCCGAAAG; GAPDH 5-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3 inversa: 5-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3; MMP-2 directa: 5-GCCCCAGACAGGTGATCTTG-3 inversa 5-GCTTGCGAGGGAAGAAGTTGT-3. Se realizó la amplificación por PCR en el Sistema de Detección de Secuencias Prism 7900 (Applied Biosystems). El perfil del ciclo térmico utilizado fue desnaturalización a 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 10 min, seguido de ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Se utilizó 18S para normalizar ARNm. Se determinaron los niveles de expresión de ARN relativos utilizando el método de curva patrón relativa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems).

Análisis estadístico. Se realizaron ensayos para determinar la asociación entre la expresión de AXL y la formación de tumor y metástasis utilizando la prueba exacta de Fisher. Se realizaron todas las demás pruebas estadísticas utilizando el ensayo t de Student. Los valores con un valor p de < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Abreviaturas: GAS6, gen 6 específico de parada de crecimiento; MMP-2, matriz metaloproteinasas; EOC, cáncer de ovario epitelial; ECM, matriz extracelular; AKT, v-akt homólogo de oncogen timoma viral murino.

**Tabla 1.** Análisis estadístico de tinción de AXL para parámetros de tumor

Puntuación	0	1	2	3	Total
Mama					
Carcinoma ductal infiltrante					
Grado 1	3 (75)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	4
Grado 2	3 (23)	0 (0)	5 (38)	5 (38)	13
Grado 3	0 (0)	0 (0)	7 (39)	11 (61)	18
Totales	6	0	12	17	35
Valor Pearson X2 P =					
Carcinoma ductal infiltrante metastásico					
Ganglio linfático	0(0)	1 (11)	4 (44)	4 (44)	9
Ovárico					
Adenocarcinoma seroso					
Estadio II	3 (33)	0 (0)	3 (33)	3 (33)	9
Estadio III/IV	6 (9)	5 (8)	14 (22)	39 (61)	64
Total	9	5	17	42	73
Valor Pearson X2 P =					
Adenocarcinoma seroso metastásico					
Omento	3 (9)	5 (16)	6 (19)	18 (56)	32
Peritoneo	1 (3)	2 (7)	12 (40)	15 (50)	30
Totales	4	7	18	33	62

Los valores se representan como n (%). Para las células tumorales, se puntuó la tinción membranosa como 0, ausencia; 1, imposible de puntuar; 2, 5 para 60% positivo; 3, 61 para 100% positivo.

## EJEMPLO 2

Los inventores han demostrado que la inhibición de la unión de ligando GAS6 a AXL celular a través de la sobreexpresión de AXL soluble de tipo silvestre en ratones utilizando un sistema de expresión adenoviral tuvo como resultado un descenso de la carga tumoral, según las medidas del número de tumores y el tamaño del tumor, en comparación con el control sin tratar, lo que pone de relieve una vez más la importancia de GAS6 y AXL como dianas críticas y estrategias eficaces para inhibir la progresión de metástasis en modelos de ratones pre-clínicos.

En el presente documento se proporcionan variantes solubles de dominio extracelular de AXL obtenidas por ingeniería, que tienen una alta afinidad para el ligando GAS6, dando cabida a que secuestren el ligando y disminuyan la señalización de AXL endógena. Las variantes obtenidas por ingeniería tienen una afinidad esencialmente mejorada para GAS6 en comparación con AXL de tipo silvestre.

El dominio extracelular de AXL comprende dos dominios de tipo IgG y dos dominios de tipo fibronectina. El sitio de unión de GAS6 mayor está en el dominio Ig1 y el sitio de unión de GAS6 menor está en el dominio Ig2.

Para potenciar más la afinidad del sitio de unión mayor, los inventores obtuvieron por ingeniería el dominio Ig1 con puntos de ruptura de 19 -132 correspondientes a la entrada SwissProt P30530 de AXL. Se creó una biblioteca mutante realizando PCR propensa a error en el dominio Ig1 del receptor AXL utilizando técnicas de biología molecular convencionales. Se expresó la biblioteca utilizando despliegue superficial de levadura y se rastreó por separación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar mutantes que presentaban una potenciación de la afinidad de unión a GAS6 soluble. En el enfoque de rastreo de biblioteca de los inventores, se sometió a varias rondas de clasificación la biblioteca de proteína mutante en el que en cada ronda sucesiva se redujo el tamaño de la biblioteca al mismo tiempo que se enriquecía simultáneamente para la propiedad de proteína mutante deseada, que en este caso era la afinidad de unión a GAS6.

Para obtener los mutantes de AXL con una afinidad para GAS6 significativamente fuerte, en las rondas de clasificación posteriores, utilizaron clasificaciones de "velocidad de disociación". Para las clasificaciones de velocidad de disociación, primero se incubó la biblioteca de los mutantes de proteína con GAS6 soluble y después se lavó con tampón para separar GAS6 sin unir de la solución. A continuación, se incubó la biblioteca mutante en presencia de un exceso de competidor soluble durante 2, 4, 6, 12, o 24 h a temperatura ambiente. El exceso de competidor sirve para secuestrar GAS6 que se disocia de AXL desplegado en levadura, haciendo que la etapa de desunión sea irreversible. Se recogen las proteínas AXL mutantes que retienen la unión con GAS6 por FACS. El análisis de unión a GAS6 de los productos de ronda 5 de clasificación agrupados tras las etapas de velocidad de disociación de 0, 4 y 6 horas demuestra que estos productos presentan una significativa mejora con respecto a AXL de tipo silvestre en lo que se refiere a una unión persistente con GAS6 (véase Figura 12). El gráfico de barras cuantifica los datos a partir de la gráfica de puntos con la demostración de una significativa mejora de los miembros de la biblioteca. La secuenciación de estos productos identificó varias mutaciones dentro del dominio Ig1 de Axl que confieren la potenciación de la afinidad hacia Gas6 observada para los productos de ronda 5 de clasificación agrupados (Figura 12 y Tabla 2). Una 6ª ronda de clasificación enriqueció aún más a 3 clones específicos a partir de los productos de la ronda 5 de clasificación. En la Tabla 2 se muestran mutaciones de aminoácido únicas dentro de la secuencia AXL que están contenidas en los productos de la ronda 6 y la ronda 5 de clasificación. En esta tabla, el número de restos en la fila de arriba indica el resto de aminoácido en AXL de tipo silvestre. La segunda fila indica el resto que se encuentra en el AXL de tipo silvestre en una posición dada. En las filas siguientes, se especifican las mutaciones de aminoácidos presentes en el mutante dado. La ausencia de un aminoácido para un resto en particular dentro de un mutante (p.ej. un espacio en blanco o una célula en blanco en la Tabla 2) representa que el resto de aminoácido no ha mutado desde el resto de tipo silvestre. Se utiliza la notación con mayúsculas convencional para los restos de aminoácido ya que las personas especializadas en la técnica la entienden perfectamente.

Se muestran secuencias únicas de los productos de la ronda 5 y 6 de clasificación, así como las propiedades de unión de los clones agrupados en comparación con AXL de tipo silvestre, lo que demuestra una mejora esencial en la unión de GAS6 para los productos de la ronda 5 de clasificación agrupados.

Los mutantes aislados utilizando este enfoque de evolución dirigida incluyen las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Mutantes aislados utilizando evolución dirigida**

	26	32	33	74	79	87	92	127
AXL t.silv	E	G	N	S	V	D	V	G
Axl S6-1		S				G	A	R
Axl S6-2	G				M		A	E
Axl S6-5			S	N		G	A	

Según la estructura cristalina del complejo GAS6-AXL notificada por Sasaki et al. (EMBO J 2006), todas las mutaciones arriba mostradas, excepto E26G, G32S, N33S y G127R/E, se sitúan en la interfaz de unión entre AXL y GAS6.

Se seleccionaron los mutantes individuales, AXL S6-1 y AXL S6-2, de la sexta ronda de clasificación para seguir investigando. Se llevaron a cabo las valoraciones de unión en equilibrio de AXL de tipo silvestre, AXL S6-1, y AXL S6-2 para comparar la afinidad de la interacción con GAS6 de las proteínas AXL de tipo silvestre o mutante. Se ajustaron los datos a una curva sigmoideal de cuatro puntos y se tomó el punto central como la constante de unión en equilibrio,  $K_D$ . Los mutantes AXL S6-1 y AXL S6-2 presentaron sustanciales mejoras en la afinidad de unión a GAS6 en comparación con AXL de tipo silvestre (Figura 13 y Tabla 4). AXL de tipo silvestre tiene una afinidad de unión ( $K_D$ ) hacia Gas6 de  $2,4 \pm 1,2 \times 10^{-9}$  M; AXL S6-2 tiene una afinidad de unión ( $K_D$ ) hacia Gas6 de  $1,89 \pm 0,37 \times 10^{-10}$  M hacia Gas6; y AXL S6-1 tiene una afinidad de unión ( $K_D$ ) de  $1,12 \pm 0,23 \times 10^{-10}$  M hacia Gas6. Para AXL S6-1 y AXL S6-2, es una afinidad de unión a GAS6 22 veces y 12,8 veces más fuerte, respectivamente, que AXL de tipo silvestre. (Tabla 4).

Tabla 4. Afinidad de unión (KD) de proteínas AXL tipo silvestre y mutantes a Gas6.

Unión en equilibrio a Gas6			
	K <sub>D</sub> (M)	+/- (M)	Veces frente a tipo silvestre
AXL t. silvestre	2,4x10 <sup>-9</sup>	1,2x10 <sup>-9</sup>	--
S6-1 1	12x10 <sup>10</sup>	0,23x10 <sup>-10</sup>	22
S6-2	1,89x10 <sup>-10</sup>	0,37x10 <sup>-10</sup>	12,8

5 Los inventores investigaron también la estabilidad térmica de proteínas AXL de tipo silvestre y mutante utilizando exploración de dicroísmo circular de temperatura variable. Esta técnica vigila el desplegamiento de elementos  
 10 estructurales secundarios de las proteínas plegadas en función de la temperatura. La llevó un seguimiento de la elipticidad de cada proteína en función de la temperatura y se ajustaron los datos a una curva de desplegamiento de transición convencional. La temperatura de fusión (Tf) es el punto medio de la curva de desplegamiento. AXL de tipo silvestre presentó una temperatura de fusión de 41,3 ± 0,6 °C; AXL S6-1 presentó una temperatura de fusión de 54,0 ± 0,9 °C (aproximadamente 13 °C más para la estabilidad térmica que AXL de tipo silvestre); Axl S6-2 presentó una temperatura de fusión de 41,55 ± 0,02 °C (aproximadamente similar a la estabilidad térmica de AXL de tipo silvestre) (Tabla 5).

Tabla 5. Estabilidad térmica de proteínas AXL mutantes y de tipo silvestre según se determina con exploraciones de dicroísmo circular de temperatura variable

	Tf media (°C)	+/- (°C)	Aumento frente a tipo silvestre (°C)
AXL tipo silvestre	41,27	0,63	--
S6-1	54,01	0,86	12,73
S6-2	41,55	0,02	0,28

15

Tabla 2  
Mutantes Ig1 de AXL de rondas 5 y 6 de clasificación (141 clones albañorios en total secuenciados, 25 variantes únicas)

Clon	pb	AA	19	23	26	27	32	33	38	44	61	65	72	74	78	79	86	87	88	90	92	97	98	105	109	112	113	116	118	127	129	Nº rep.	
AXL tipo silvestre			A	T	E	E	G	N	T	T	H	D	A	S	Q	V	Q	D	D	I	V	I	T	T	Q	V	F	H	T	G	E		
AXL S6-1	6	4				S											G			A									R			62	
AXL S6-2	5	4			G								M							A									E			21	
AXL S6-5	5	4					S						N				G			A												1	
AXL S5-1	3	3										V								A	R											1	
AXL S5-2	2	1																		A												16	
AXL S5-4	1	1												E						A												1	
AXL S5-6	1	1										V																				7	
AXL S5-9	4	3														R			V	A												10	
AXL S5-13	3	2										V								D												1	
AXL S5-22	2	2								N							G															1	
AXL S5-24	4	2															G															2	
AXL S5-29	9	6								Y		V						N		A												1	
AXL S5-30	4	2										V																				1	
AXL S5-39	10	5							A			V							V				M									1	
AXL S5-40	3	1																			G											2	
AXL S5-45	5	4																			A				A	L						1	
AXL S5-51	3	2																			A											1	
AXL S5-53	3	2															G					P										1	
AXL S5-59	3	2							I												A											2	
AXL S5-66	2	1															G															3	
AXL S5-68	5	2										V									A											1	
AXL S5-74	2	2			M																A						L					1	
AXL S5-76	2	2															R				A											1	
AXL S5-77	4	2			G	G													M		A											1	
AXL S5-78	2	2																		A												1	
																																	141
TOTAL DE LECTURAS																																	

\*pb = número de apareamientos erróneos de ADN, AA = número de mutaciones de aminoácido. Nota: algunas mutaciones de ADN son silenciosas. El número de veces que aparece un clon en particular en total se indica en la columna que está más a la derecha.

**Ejemplo 3**

Variantes AXL soluble inhiben progresión de tumor metastásico *in vivo*

5 Se ha relacionado la señalización de GAS6-AXL en la progresión de muchas formas agresivas de tumores sólidos, incluyendo mama, pulmón y colon y, recientemente, a través del trabajo que se expone en el presente documento, cáncer de ovario. Si bien se ha observado una clara correlación entre la expresión de AXL y el estadio de la enfermedad y el pronóstico del paciente, la validación de AXL como diana terapéutica para el tratamiento de metástasis sigue estando inexplorada en gran medida. En el Ejemplo 1, los inventores demostraron que AXL es de hecho un marcador de la metástasis en pacientes con cáncer de mama y de ovario, y que los niveles de expresión de AXL guardan una correlación con la gravedad de la enfermedad. Estos resultados indican que la antagonización de la ruta de señalización de GAS6-AXL puede ofrecer una ventana terapéutica para el tratamiento de enfermedad metastásica. Tal como se ha señalado en el Ejemplo 1, para validar el potencial de AXL como diana terapéutica, se administró una forma soluble del dominio extracelular de AXL de tipo silvestre utilizando entrega adenoviral en un modelo de ratón de cáncer de ovario humano agresivo. Los inventores demostraron que la metástasis de tumor se reducía significativamente en los ratones que habían recibido tratamientos con AXL soluble en comparación con los controles. Estos datos demostraron que la antagonización de la señalización de GAS6-AXL en células de tumor utilizando AXL soluble pudo inhibir la progresión metastásica de la enfermedad. Basándose en estos resultados, los inventores demostraron que mutantes de AXL obtenidos por ingeniería con una mayor afinidad para GAS6 provocaban una mayor eficacia como agentes anti-metastásicos y que un modo de entrega de AXL soluble terapéuticamente más relevante producía unos resultados aún más significativos.

En este estudio, los inventores utilizaron el mismo modelo de cáncer de ovario humano señalado en el Experimento 1 y administraron variantes de AXL soluble (sAXL) purificado por vía intraperitoneal a ratones con enfermedad metastásica pre-existente. Sometieron a ensayo AXL de tipo silvestre y AXL S6-1, el mutante de alta afinidad obtenido por ingeniería, y compararon ambos a una forma de AXL, E59R/T77R, en la que se abolió la unión a GAS6. Los resultados mostraron de forma llamativa que la potenciación de la afinidad de AXL S6-1 tiene como resultado una mayor eficacia terapéutica, ya que observó una significativa reducción de la carga tumoral, según la evaluación del número y el peso total de todas las lesiones metastásicas, con respecto a AXL de tipo silvestre y el control negativo de AXL E59R/T77R. Estos hallazgos validan una vez más que AXL y GAS6 como agentes terapéuticos para la inhibición de metástasis y corroboran que el mutante de AXL de alta afinidad obtenido por ingeniería S6-1 es un potente antagonista del sistema de señalización de GAS6-AXL.

Si bien el Ejemplo 1 demuestra que la entrega adenoviral de sAXL rindió eficacia terapéutica, este método de entrega no es clínicamente pertinente y por tanto los inventores confirmaron que la entrega de sAXL purificado rendiría resultados similares. Se fundieron AXL de tipo silvestre, AXL S6-1 y AXL E59R/T77R con el fragmento cristalizante, región (Fc) de IgG2a de ratón para mejorar la farmacocinética. Las únicas diferencias entre estas tres variantes de fusión de AXL (AXL-Fc) son mutaciones encontradas en el dominio Ig1 de AXL, señaladas en la Tabla 6A. Se clonó ADN que codifica las proteínas AXL-Fc en vector lanzadera adenoviral pADD2 activado por CMV utilizando sitios de restricción EcoRI y Sall. Se transfectó independientemente el plásmido pADD2 que codifica estos tres mutantes AXL en células 293 HEK utilizando el kit Freestyle Expression de Life Technologies, según la descripción del fabricante. Se purificaron proteínas desde el sobrenadante de cultivo utilizando cromatografía de afinidad de Proteína A seguido de cromatografía de exclusión por tamaño.

45 **Tabla 6**

Nombre de proteína	Descripción
AXL-Fc de tipo silvestre	Dominio extracelular de AXL de tipo silvestre, aminoácidos 19-440 fusionado con la región Fc de IgG2a de ratón.
AXL S6-1-Fc	Fusión AXL-Fc como AXL-Fc de tipo silvestre anterior, salvo que el dominio Ig1 de AXL contiene las siguientes mutaciones para S6-1: G32S, D87G, V92A, G127R
AXL E59R/T77R-Fc	Fusión AXL-Fc como AXL-Fc de tipo silvestre anterior, salvo que el dominio Ig1 de AXL contiene mutaciones E59R y T77R, que disminuyeron significativamente la unión hacia Gas6

Para evaluar la capacidad de los mutantes AXL-Fc de inhibir la metástasis *in vivo*, los inventores utilizaron el mismo modelo de xenoinjerto peritoneal de cáncer de ovario humano que se ha señalado en el Ejemplo 1. Este modelo recapitula la diseminación de metástasis de cáncer de ovario humano, ya que los ratones desarrollan rápidamente una enfermedad altamente invasiva que consiste en ascitis y muchas lesiones metastásicas pequeñas (>100) cuatro semanas después de la administración de células SKOV3ip.1. Este modelo es una representación muy precisa del cáncer de ovario humano ya que la mayoría de los pacientes presentan una enfermedad metastásica significativa en el diagnóstico. Se inyectó a los ratones células SKOV3ip.1 Se dejó que se sedimentaran las células y los tumores durante siete días. El día siete, los inventores dividieron aleatoriamente los ratones en tres grupos de estudio y comenzaron a administrar los tratamientos con AXL-Fc de tipo silvestre, S6-1-Fc o E59R/T77R-Fc. Se administraron proteínas purificadas disueltas en solución salina tamponada con fosfato a los ratones dos veces a la semana durante tres semanas con una posología de 10 mg/kg, durante un total de seis dosis. El día veintiocho, se sacrificó a todos los ratones y se realizaron las necropsias para evaluar la carga tumoral global según la medición del número

de lesiones metastásicas visibles y el peso total de todas las lesiones. Se observaron profundas diferencias entre los grupos de tratamiento y las imágenes representativas que se presentan en la Figura 14. Los ratones que recibieron el tratamiento de control negativo de E59R/T77R-Fc tuvieron una media de  $86,3 \pm 21,9$  metástasis peritoneales. Para los ratones que recibieron AXL-Fc de tipo silvestre, el número se redujo a  $48,1 \pm 6,9$ , mientras que en los ratones del grupo de AXL obtenido por ingeniería, S6-1-Fc, se observó tan solo  $8,3 \pm 1,6$  lesiones metastásicas como media (Figura 15 (panel de arriba)). Se extirparon todas las lesiones visibles y se pesaron colectivamente, para cada ratón, para evaluar la carga tumoral metastásica global. El grupo de tratamiento con AXL obtenido por ingeniería (S6-1-Fc) presentó una vez más una profunda respuesta, ya que los grupos de tratamiento E59R/T77R-Fc, Fc tipo silvestre y S6-1-Fc presentaron cargas tumorales de  $567 \pm 92$ ,  $430 \pm 36$  y  $188 \pm 55$  mg, respectivamente, Figura 15 (panel de abajo).

En conjunto, estos hallazgos validan AXL como diana terapéutica para el tratamiento de metástasis y demuestran que la neutralización del ligando de AXL, GAS6, es una estrategia de tratamiento anti-metastásico eficaz. Lo que es más importante, una proteína que comprende una fusión AXL-Fc que no presenta unión detectable a Gas6 (AXL E59R/T77R-Fc) no evita la metástasis de tumor; una proteína que comprende una fusión AXL-Fc que se une a Gas6 con afinidad moderada (AXL-Fc de tipo silvestre) presenta una ligera inhibición de la metástasis de tumor; una proteína que comprende una fusión AXL-Fc con una fuerte afinidad a Gas6 (AXL S6-1-Fc) presenta una significativa inhibición de metástasis de tumor. En conjunto, esto demuestra que el epítipo de interacción para Gas6 y AXL es crítico en la metástasis de tumor y una potente inhibición de dicho epítipo en Gas6 a través de la proteína AXL S6-1-Fc inhibe significativamente la metástasis de tumor. Siendo así, la proteína AXL S6-1-Fc, o cualquier proteína que bloquee potencialmente la interacción Gas6-Axl, constituye un candidato terapéutico prometedor contra enfermedad metastásica. Por otra parte, los inventores demuestran asimismo que la administración directa de proteína AXL soluble purificada es un método de tratamiento viable, con la validación clínica de este enfoque.

### 25 Métodos para el Ejemplo 3

Líneas celulares. Se cultivaron células SKOV3ip.1 ováricas en medio apropiado suplementado 10 % de suero bovino fetal y 1% de penicilina y estreptomycin a 37 °C en una incubadora al 5% CO<sub>2</sub>.

30 Fusiones AXL-Fc. Se clonaron mutantes de AXL de longitud completa, aminoácidos 19-440, en el vector lanzadera adenoviral pADD2 activado con CMV como fusiones directas para la región IgG2a Fc de ratón. La transfección de ADN transitoria de células 293 de riñón embrionario humano (HEK) fue completada utilizando el kit Freestyle Expression de Life Technologies, según la descripción del fabricante. Se purificaron las proteínas de fusión con Fc desde el sobrenadante de cultivo al cabo de cinco días por cromatografía de afinidad de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Se colocaron las proteínas purificadas en una solución salina tamponada con fosfato sin ningún aditivo o vehículo adicional.

40 Xenoinjertos peritoneales de SKOV3ip.1. Todos los procedimientos que implicaron animales y su cuidado fueron aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Stanford de acuerdo con las directrices de los NIH e institucionales. Se inyectó a ratones desnudos hembra de seis semanas de vida por vía intraperitoneal  $1 \times 10^6$  células SKOV3ip.1., siete días después de la administración de las células, se dividieron aleatoriamente a los ratones en tres grupos para el tratamiento con S6-1-Fc, AXL-Fc de tipo silvestre o E59R/T77R-Fc. Se administró proteína AXL-Fc soluble purificada por inyecciones por vía intraperitoneal dos veces a la semana con una posología de 10 mg/kg. Se continuó esta misma posología durante tres semanas, tras las cuales se sacrificó a los ratones. Se realizaron las necropsias en las que se hizo el recuento de las lesiones metastásicas y a continuación, se extirparon para pesarlas de forma colectiva. Se determinó la carga tumoral según el número total de lesiones y el peso global de todo el tejido enfermo para cada ratón.

50 Análisis estadístico: Se utilizó el ensayo t de Student y los errores registrados son los valores del error típico de la media (SEM) y se consideró un valor p de < 0,01 como significativo.

### LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University  
 <120> Inhibición de la señalización AXL en terapia antimetastásica  
 <130> AHB/FP6837793  
 <140> EP 11735264.1  
 <141> 21-01-2011

60 <150> PCT/US2011/022125  
 <151> 21-01-2011

<150> US 61/336.478  
 <151> 22-01-2010

65 <160> 17

ES 2 632 345 T3

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1  
 <211> 894  
 <212> PRT  
 <213> *H. sapiens*

5

<400> 1

```

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

10

ES 2 632 345 T3

290						295					300				
Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp
305					310					315					320
Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro
				325					330					335	
Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Phe	Val	His
				340				345					350		
Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg
				355			360						365		
Leu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly
				370		375						380			
Leu	Arg	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser
385					390					395					400
Asn	Leu	Thr	Val	Cys	Val	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro
				405					410					415	
Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln
				420				425					430		
Pro	Val	His	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp
				435			440					445			
Pro	Trp	Trp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val
				450			455					460			
Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg
465					470					475					480
Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Val
				485					490					495	
Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr
				500				505						510	
Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Arg	Asp
				515			520					525			
Val	Met	Val	Asp	Arg	His	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu
				530		535						540			
Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val	Met	Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Ser
545					550					555					560
Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg
				565					570					575	
Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe
				580				585					590		
Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser
				595			600					605			
Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys
				610			615					620			
His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln
625					630						635				640
Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	Gln	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile
				645						650				655	
Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Phe	Ile	His	Arg	Asp
				660				665					670		
Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asn	Glu	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Val
				675			680					685			
Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg
				690			695				700				
Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys	Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser
705					710						715				720
Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly
				725					730					735	
Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly
				740				745					750		
Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu
				755			760					765			
Lys	Gln	Pro	Ala	Asp	Cys	Leu	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg
				770			775				780				
Cys	Trp	Glu	Leu	Asn	Pro	Gln	Asp	Arg	Pro	Ser	Phe	Thr	Glu	Leu	Arg
785					790						795				800
Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro
				805					810						815

ES 2 632 345 T3

**Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu**  
 820 825 830  
**Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro**  
 835 840 845  
**Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly**  
 850 855 860  
**Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala**  
 865 870 875 880  
**Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala**  
 885 890

5 <210> 2  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 2

**Arg Met Phe Ser Gly Thr Pro Val Ile Arg Leu Arg Phe Lys Arg Leu**  
 1 5 10 15  
**Gln Pro Thr**

15 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 3

**Val Gly Arg Val Thr Ser Ser Gly Pro**  
 1 5

25 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 4

**Arg Asn Leu Val Ile Lys Val Asn**  
 1 5

40 <210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido Sintético

<400> 5

**Asp Ala Val Met Lys Ile Ala Val Ala**  
 1 5

50 <210> 6



<220>  
 <223> Oligonucleótido Sintético

5  
 <400> 11  
 tccattattc ctagctgagg tatc 24

10  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Sintético

20  
 <400> 12  
 gtgggcaacc cagggaatat c 21

25  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Sintético

35  
 <400> 13  
 gtactgtccc gtgtcggaaa g 21

40  
 <210> 14  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Sintético

50  
 <400> 14  
 atggggaagg tgaaggtcg 19

55  
 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Sintético

65  
 <400> 15  
 ggggtcattg atggcaacaa ta 22

70  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

75  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Sintético

80  
 <400> 16  
 gccccagaca ggtgatcttg 20

85  
 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

5

<400> 17

gcctgcgagg gaagaagtg t 21

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido variante de AXL soluble, en donde dicho polipéptido carece del dominio transmembrana AXL y tiene un conjunto de modificaciones de aminoácido de la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 1) Gly32Ser, Asp87Gly, Val92Ala y Gly127Arg,  
2) Glu26Gly, Val79Met, Val92Ala y Gly127Glu; y  
3) Gly32Ser, Ala72Val, Asp87Gly, Val92Ala y Gly127Arg;
- 15 en donde dicha modificación aumenta la afinidad de unión del polipéptido AXL a la proteína 6 específica de parada de crecimiento (GAS6); y en donde la posición de cada modificación de aminoácido está representada como n, y n+7 equivale a la numeración de SEQ ID NO: 1.
- 20 2. El polipéptido variante de AXL soluble de la reivindicación 1, en donde el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc.
3. El polipéptido variante de AXL soluble de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido variante de AXL soluble tiene una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M o  $1 \times 10^{-9}$  M para GAS6.
- 25 4. El polipéptido variante de AXL soluble de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido variante de AXL soluble inhibe la interacción entre AXL de tipo silvestre y GAS6.
5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polipéptidos variantes de AXL soluble de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende además al menos un agente citotóxico o un excipiente farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos.
7. El polipéptido variante de AXL soluble de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o composición de las reivindicaciones 5 o 6, para su uso en un método de tratamiento, reducción o prevención de metástasis o invasión de un tumor en un paciente mamífero.
- 35 8. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste en un tumor de ovario, un tumor de mama, un tumor de pulmón, un tumor de hígado, un tumor de colon, un tumor de vesícula biliar, un tumor pancreático, un tumor de próstata y glioblastoma.

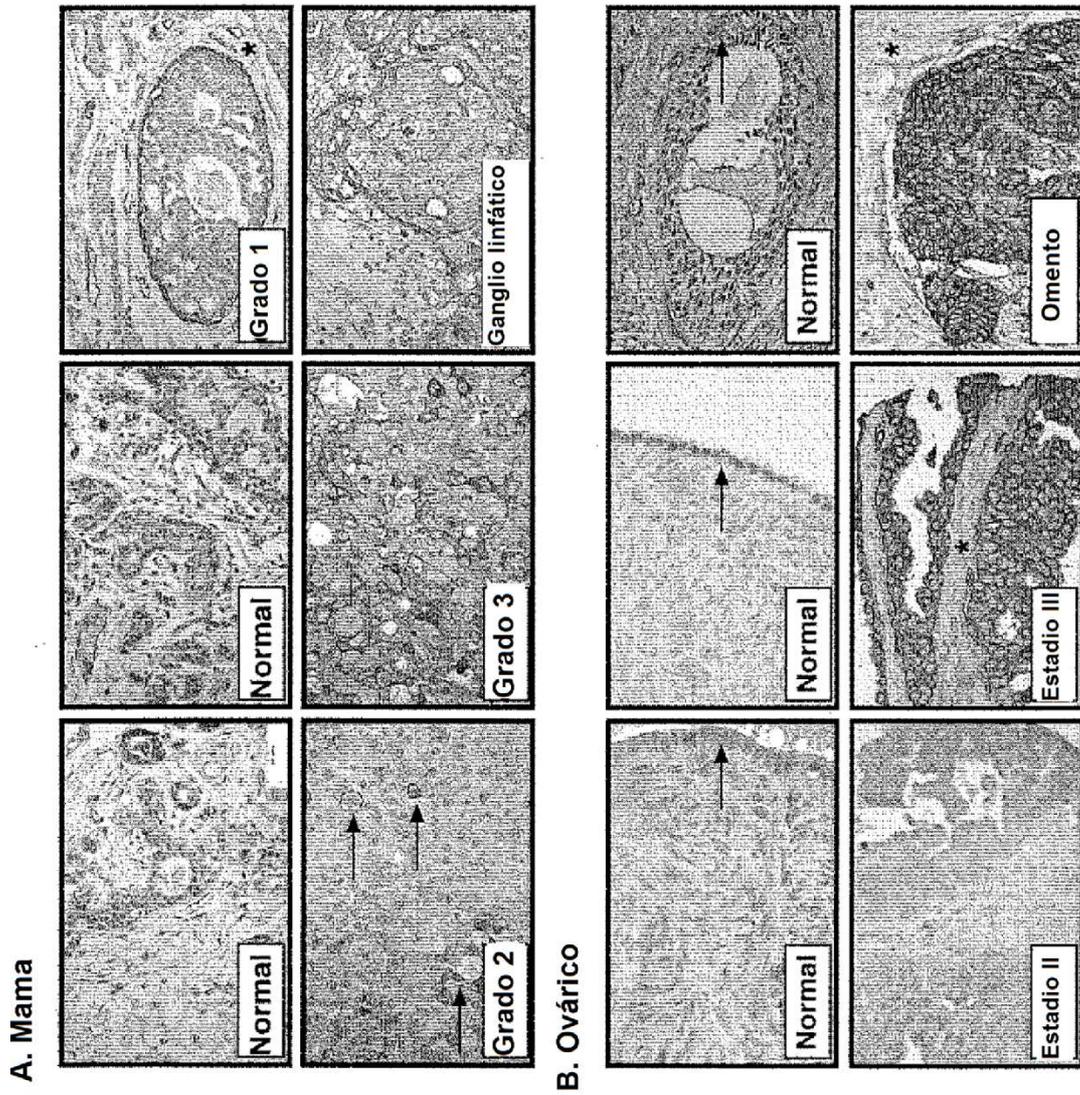


FIGURA 1

FIGURA 2

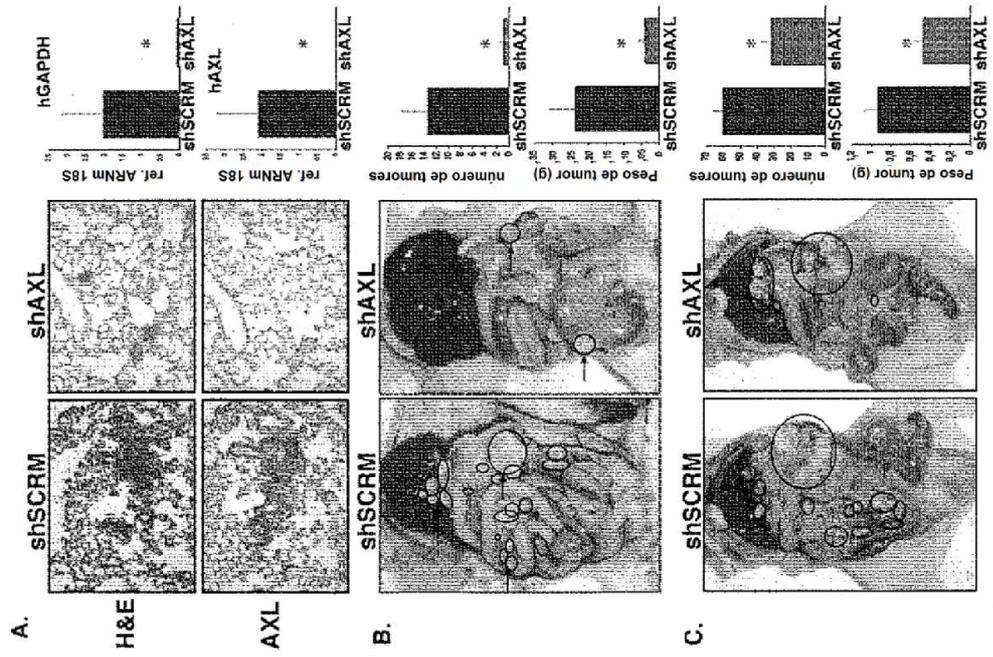
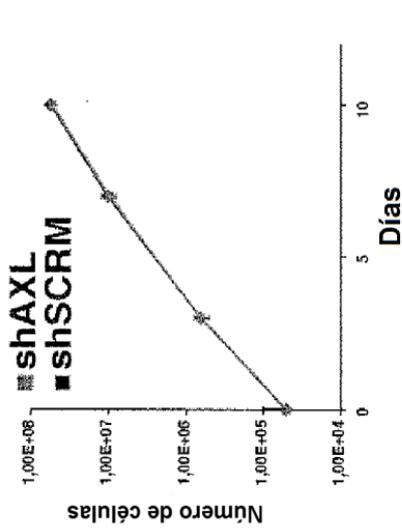


FIGURA 3

A.

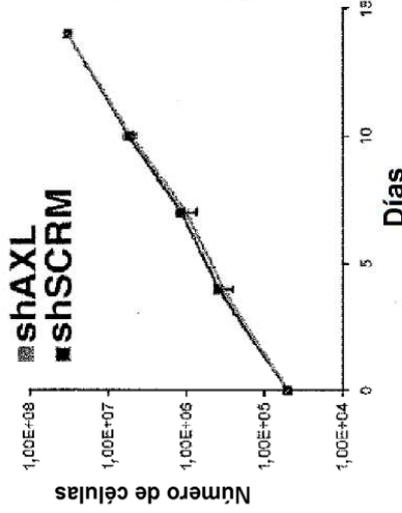
Mama

MDA-231

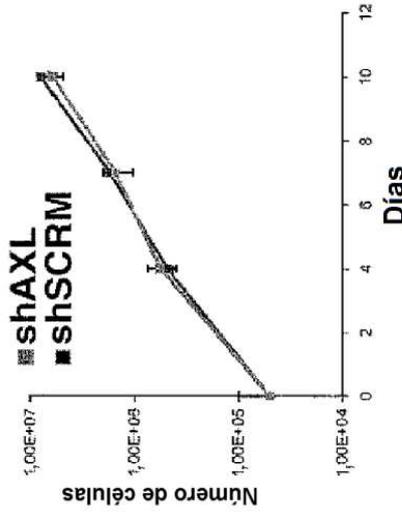


Ovário

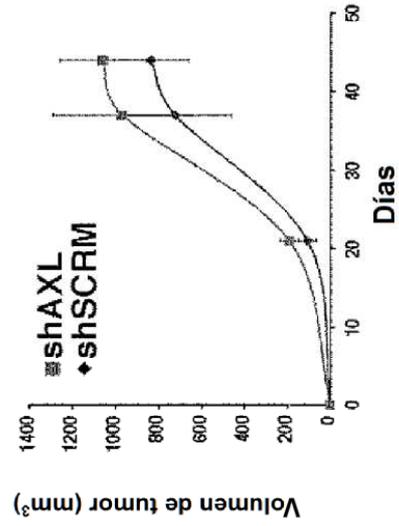
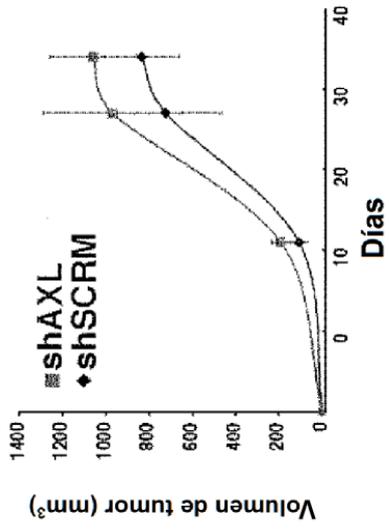
SKOV3ip.1



OVCAR-8



B.



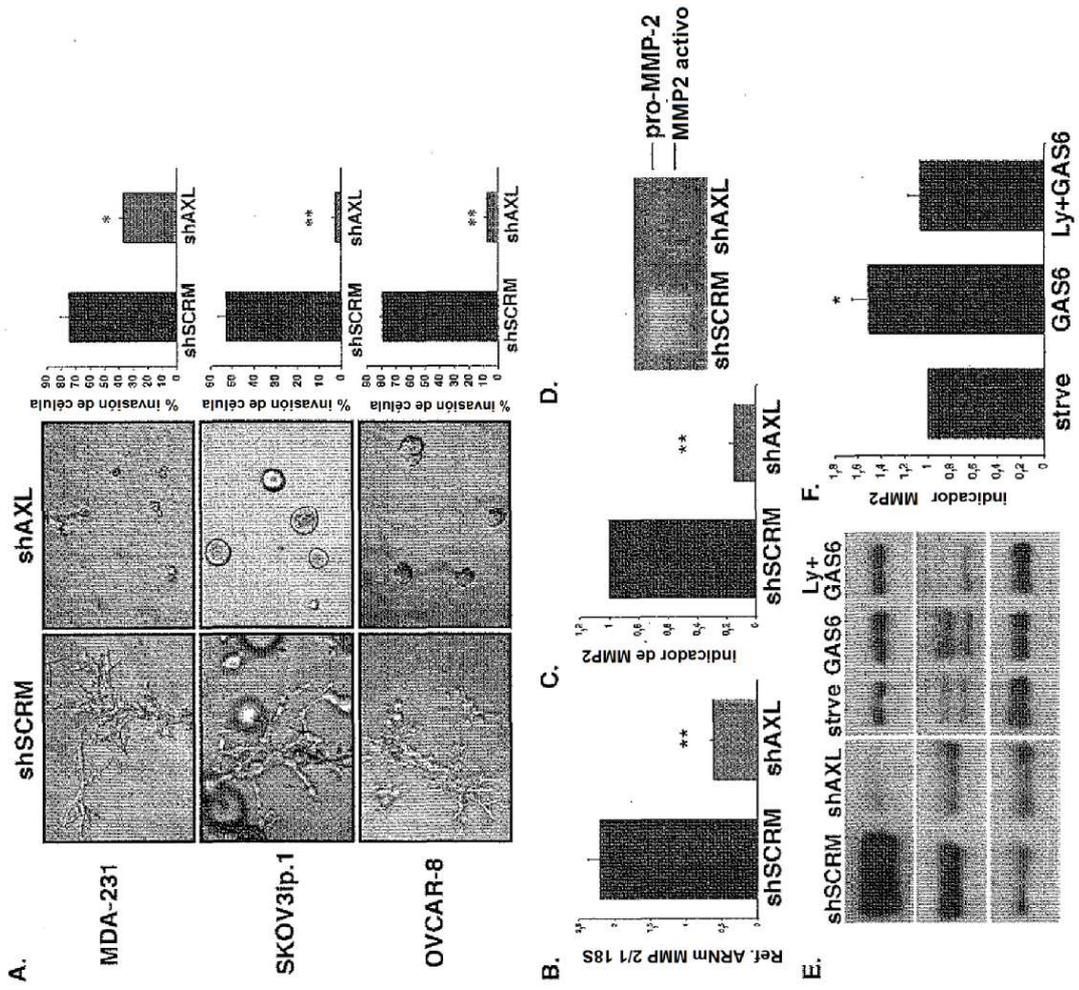


FIGURA 4

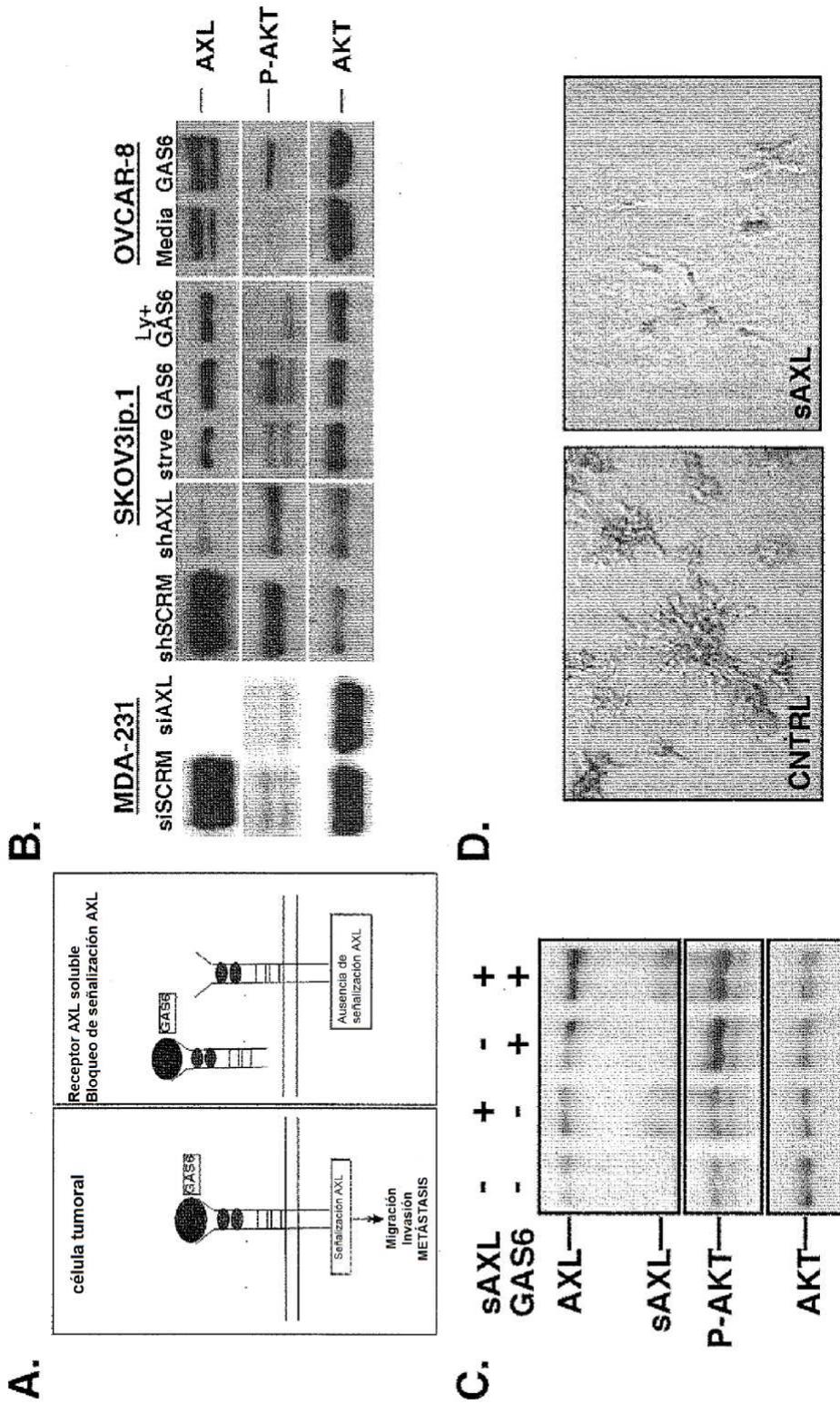


FIGURA 5

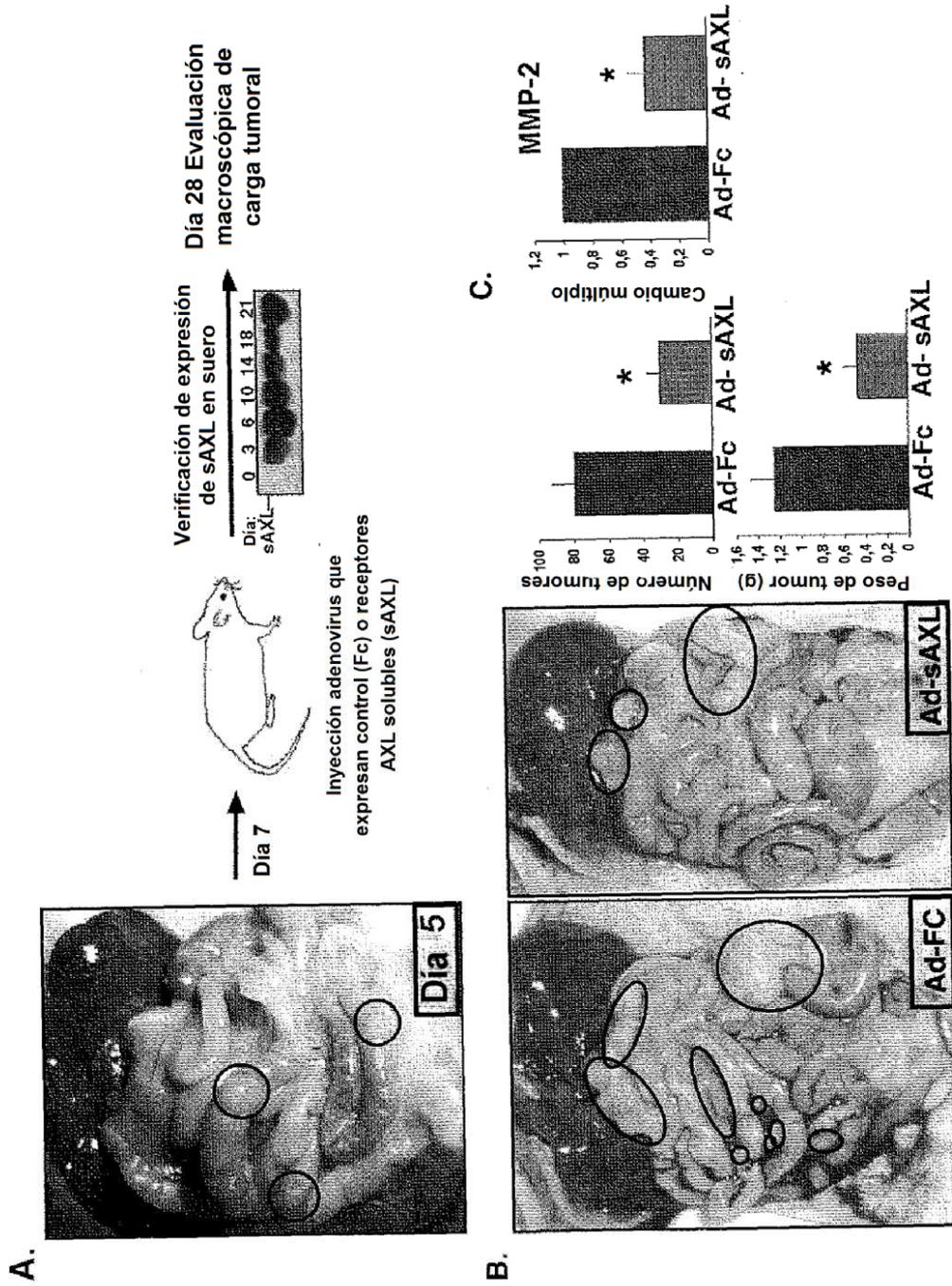


FIGURA 6

Parámetro	Fc	AXL	Intervalo normal
<b>Hígado</b>			
ALT (U/l)	83 +/- 31	64 +/- 7	76 - 160
AST (U/l)	242 +/- 195	127 +/- 18	192 - 388
<b>Riñón</b>			
BUN (mg/dl)	23 +/- 8	23 +/- 1	20,3 - 24,7
Creatinina (mg/dl)	0,3 +/- 0,1	0,3 +/- 0	0,1 - 1,1
<b>Hematológico</b>			
HCT (%)	41 +/- 0,5	41 +/- 0,5	39 - 47
RBC (M/ul)	8 +/- 0,4	8 +/- 0,2	7 - 8,8
HGB (g/dl)	13 +/- 0,2	13 +/- 0,2	13,7 - 16,4
WBC (K/ul)	17 +/- 3	14 +/- 14	5,5 - 9,3

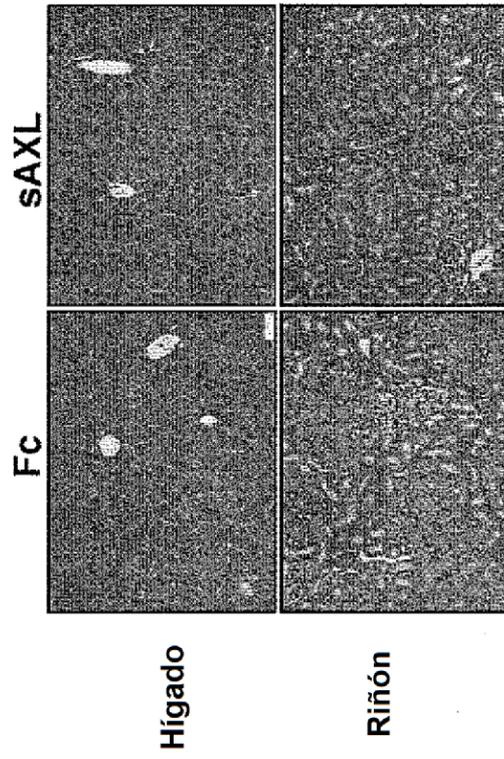


FIGURA 7

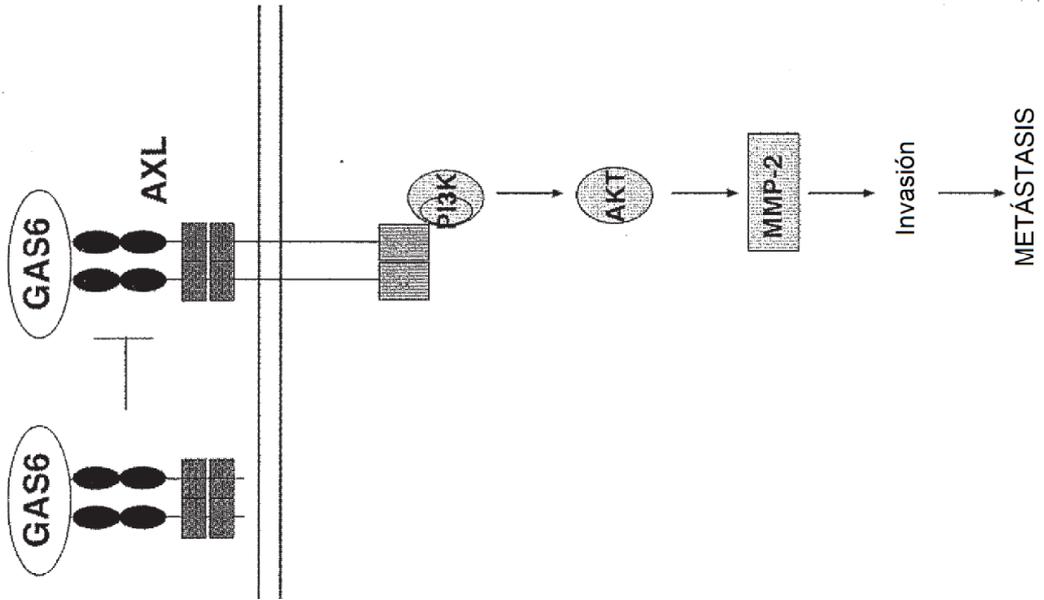


FIGURA 8

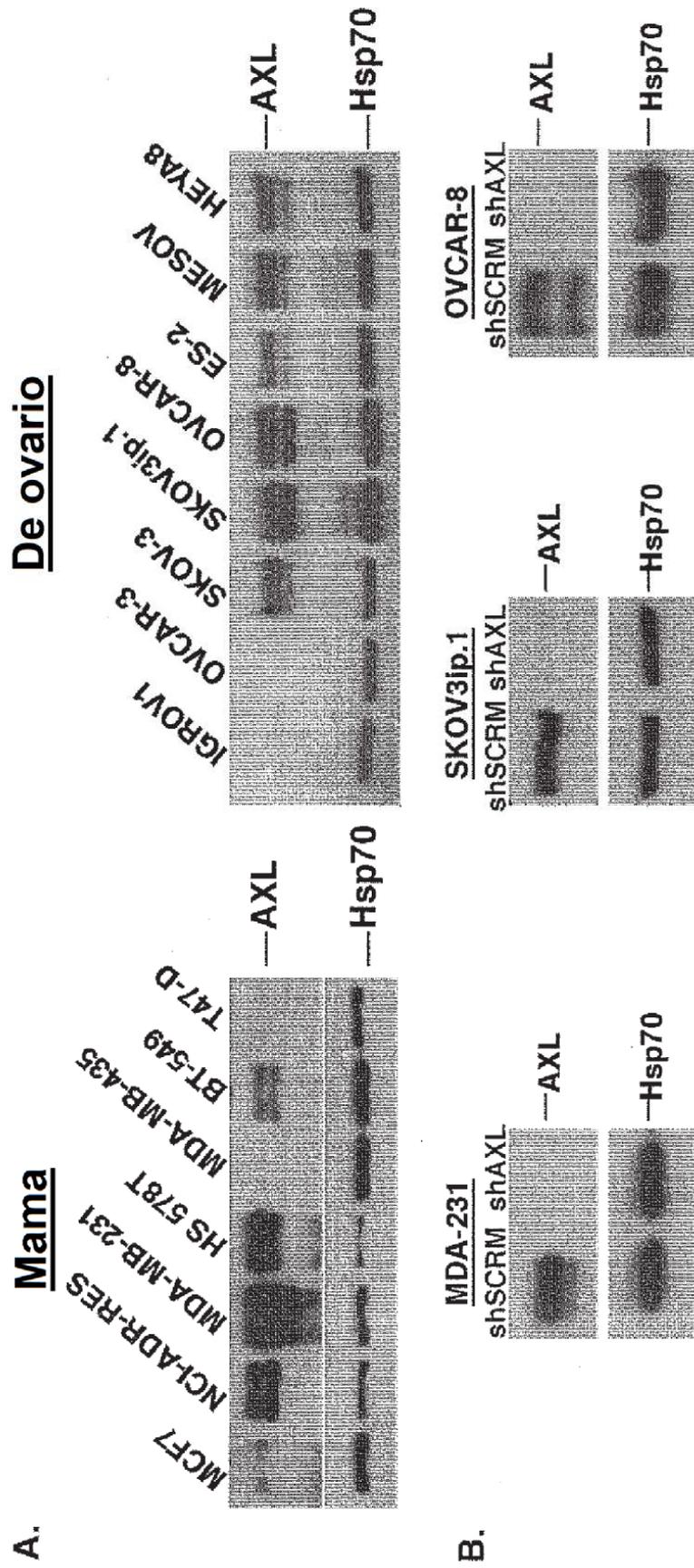


FIGURA 9

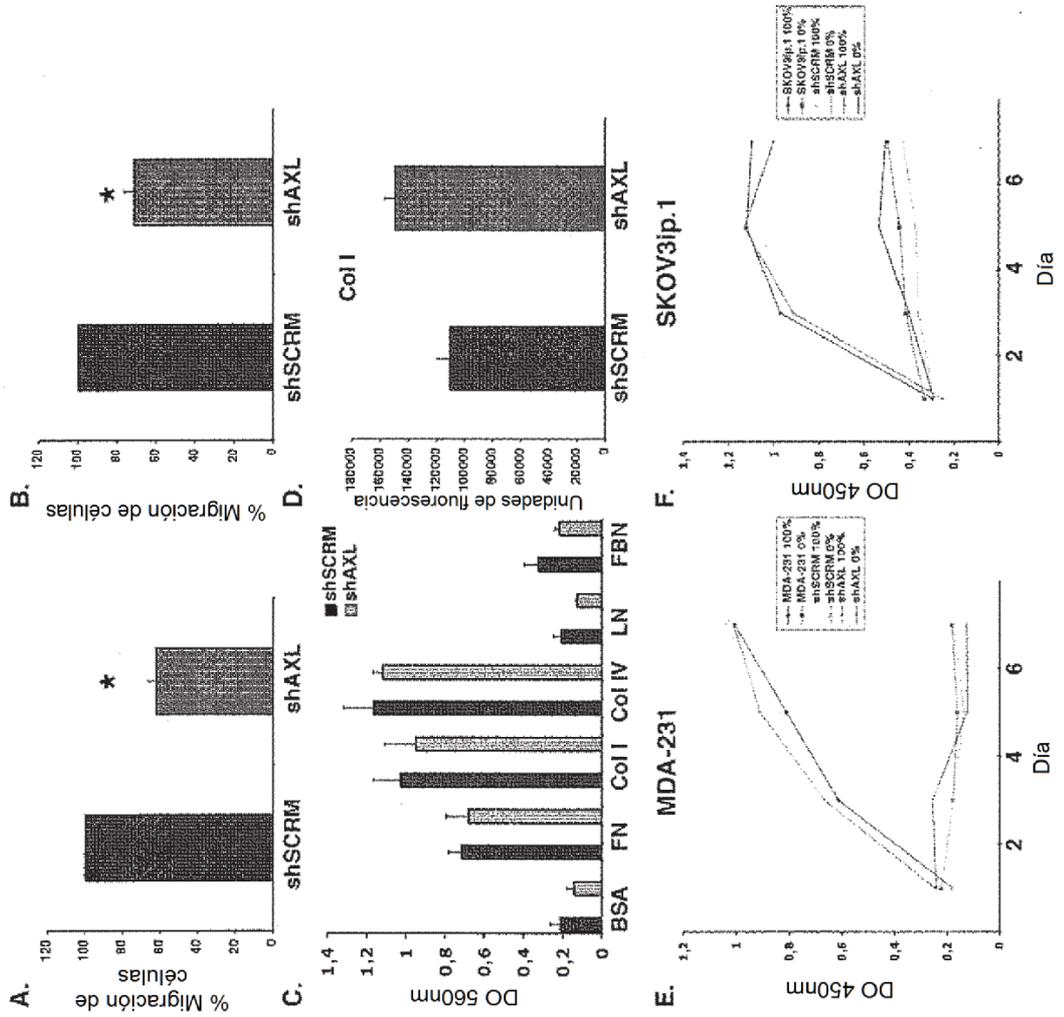


FIGURA 10

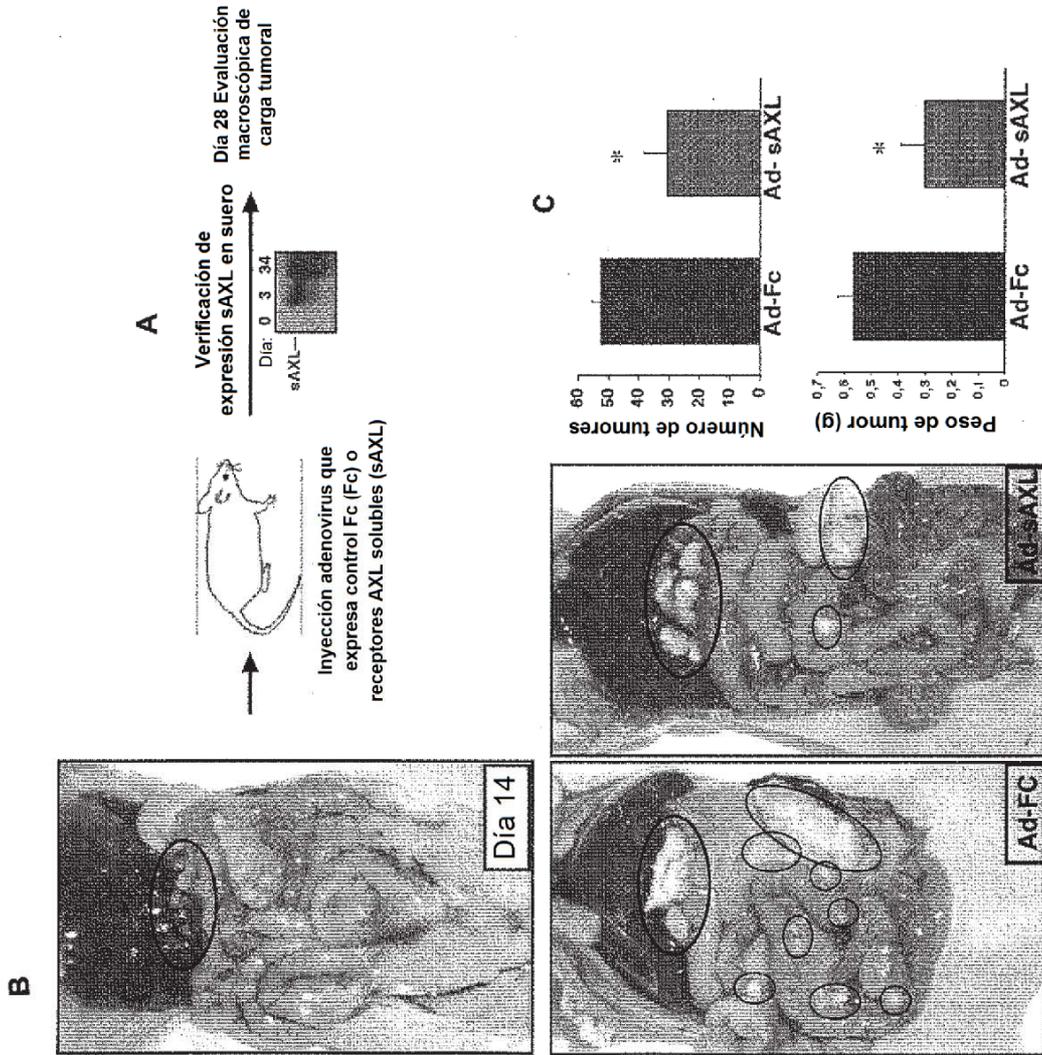
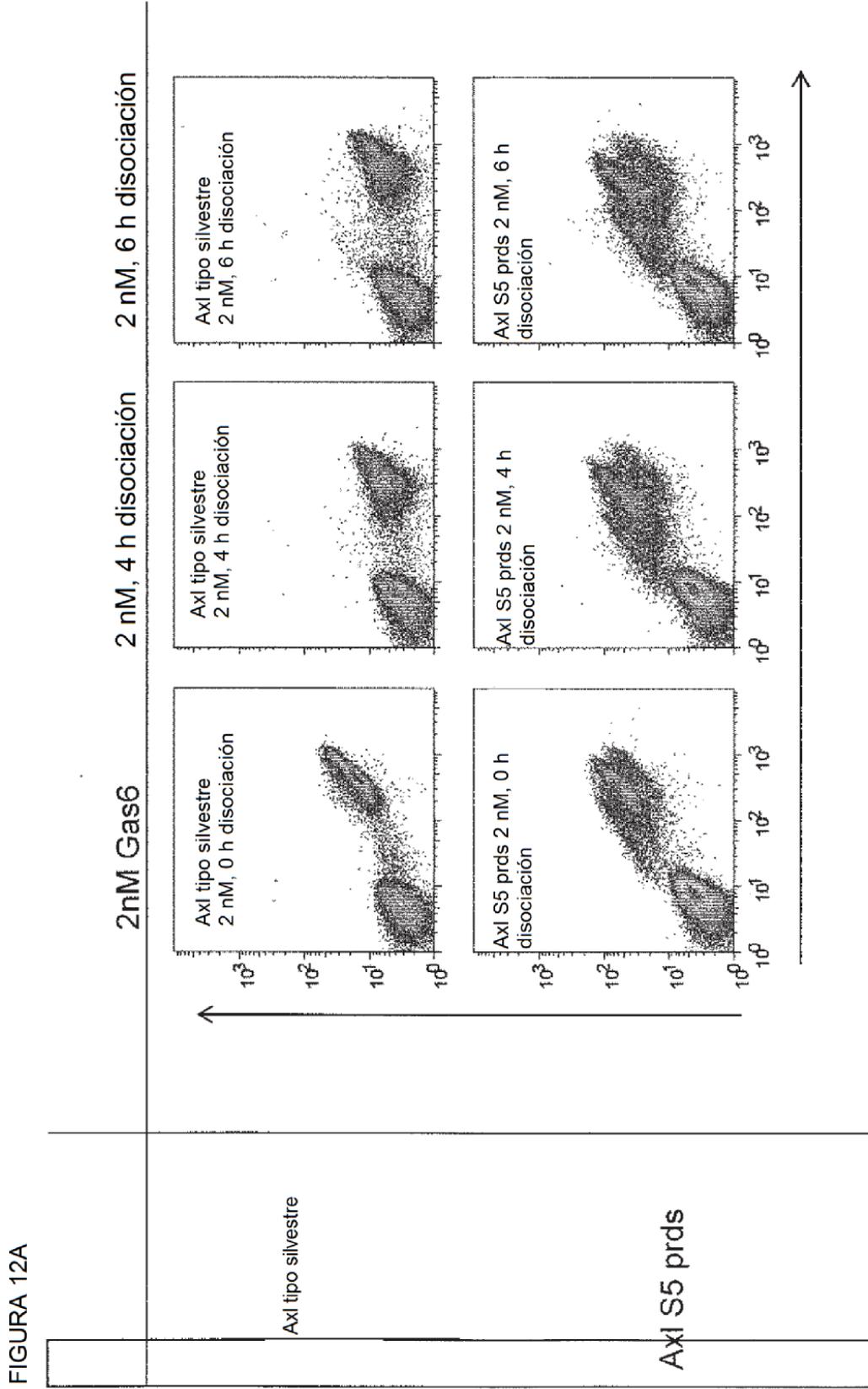


FIGURA 11



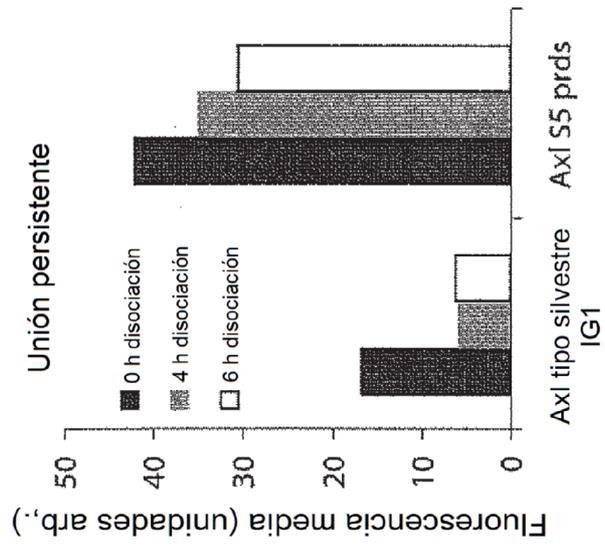


FIGURA 12B

FIGURA 13

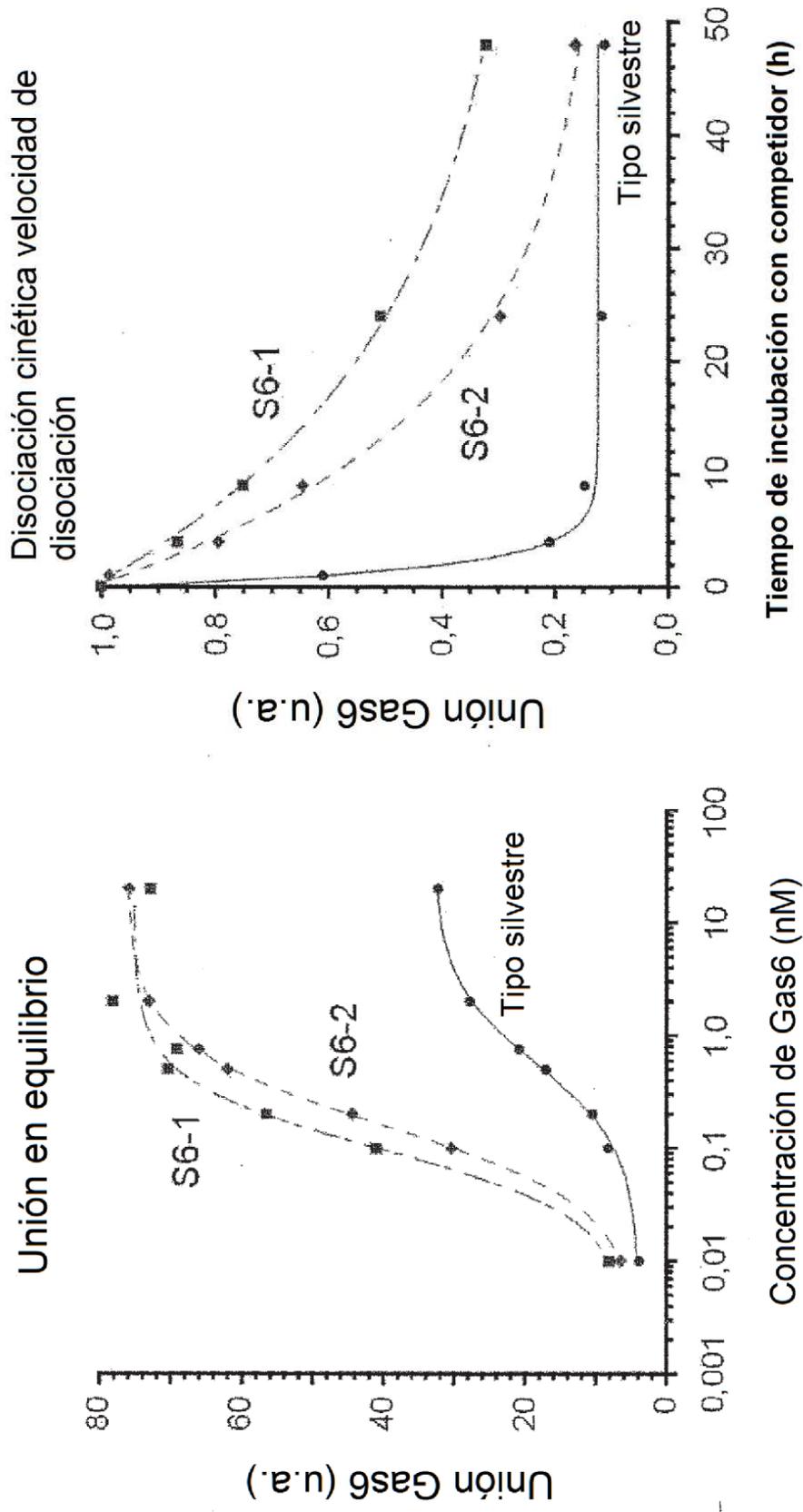
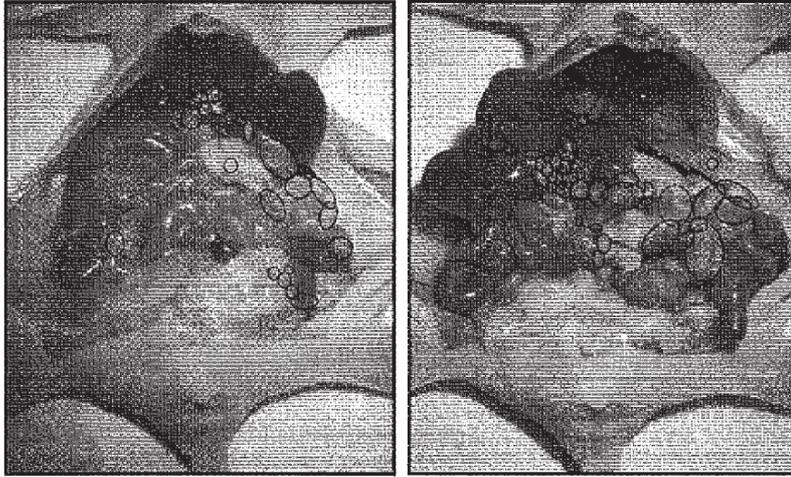
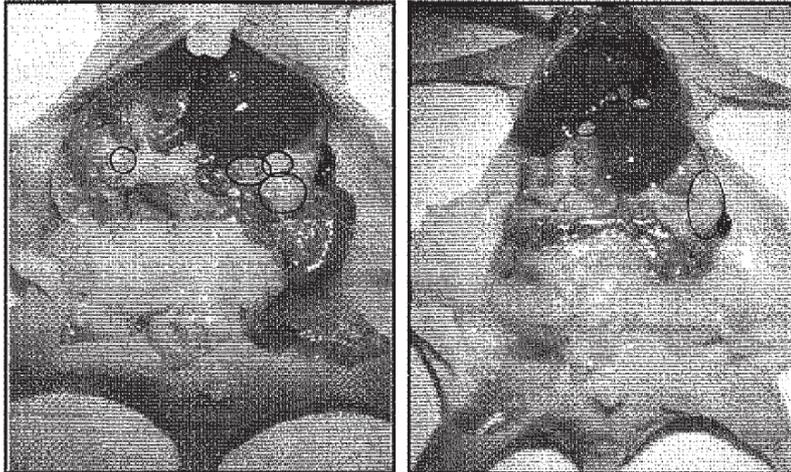


FIGURA 14

AXL E59R/T77R-Fc



AXL tipo silvestre - Fc



AXL S6-1-Fc

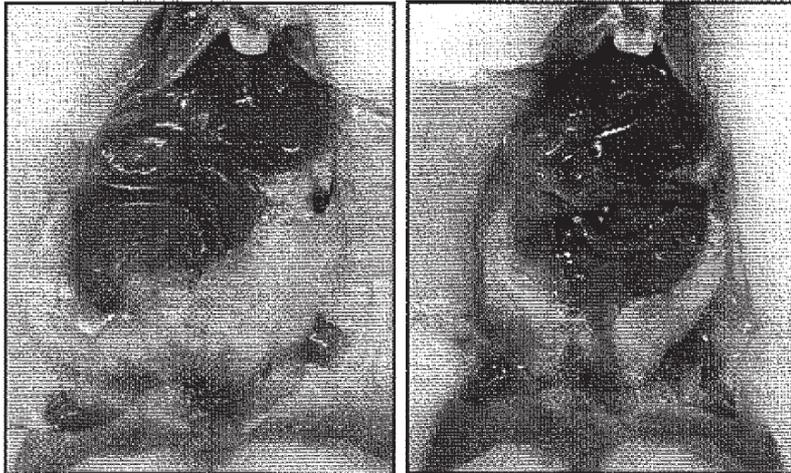


FIGURA 15

Tratamiento con proteínas sAXL – Fc en ratones portadores de tumores ováricos SKOV3ip.1

