



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107082805 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201610819620.7

(22)申请日 2011.01.21

(30)优先权数据

61/336,478 2010.01.22 US

(62)分案原申请数据

201180014940.0 2011.01.21

(71)申请人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 阿马托·J·贾科西亚

艾瑞恩·布鲁诺·兰金

詹尼弗·R·科克伦

道格拉斯·琼斯

米哈利斯·卡里欧利斯

凯瑟琳·富 缪钰

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11363

代理人 郭放 许伟群

(51)Int.Cl.

*G07K 14/705*(2006.01)

*C12N 9/12*(2006.01)

*A61K 38/17*(2006.01)

*A61P 35/00*(2006.01)

*A61P 35/04*(2006.01)

权利要求书1页 说明书31页

序列表3页 附图15页

(54)发明名称

抗转移疗法中AXL信号传导的抑制

(57)摘要

提供用于通过施用治疗剂量的药物组合物来缓解哺乳动物的癌症的组合物和方法,所述药物组合物例如通过竞争性或非竞争性抑制AXL与其配体GAS6之间的结合相互作用来抑制AXL蛋白的活性。

1. 一种可溶性AXL变体多肽,其中所述多肽缺乏AXL跨膜域且相对于野生型AXL序列包含至少一个氨基酸修饰,且其中所述改变增加所述AXL多肽结合于GAS6的亲和力。

2. 根据权利要求1所述的可溶性AXL变体多肽,其中所述可溶性AXL变体多肽在所述野生型AXL序列(SEQ ID NO:1)的选自由以下组成的组的区域中包含至少一个氨基酸修饰:1) 15-50之间,2) 60-120之间,和3) 125-135之间。

3. 根据权利要求1所述的可溶性AXL变体多肽,其中所述可溶性AXL变体多肽包含在所述野生型AXL序列(SEQ ID NO:1)的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或127位的至少一个氨基酸修饰或它们的组合。

4. 根据权利要求1所述的可溶性AXL变体多肽,其中所述可溶性AXL变体多肽包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸修饰:1) A19T,2) T23M,3) E26G,4) E27G或E27K,5) G32S,6) N33S,7) T38I,8) T44A,9) H61Y,10) D65N,11) A72V,12) S74N,13) Q78E,14) V79M,15) Q86R,16) D87G,17) D88N,18) I90M或I90V,19) V92A、V92G或V92D,20) I97R,21) T98A或T98P,22) T105M,23) Q109R,24) V112A,25) F113L,26) H116R,27) T118A,28) G127R或G127E,和29) G129E,和它们的组合。

5. 根据权利要求1所述的可溶性AXL变体多肽,其中所述AXL变体包含相对于所述野生型AXL序列(SEQ ID NO:1)在以下位置的氨基酸改变:(a) 甘氨酸32;(b) 天冬氨酸87;(c) 缬氨酸92;和(d) 甘氨酸127。

6. 根据权利要求1所述的可溶性AXL变体多肽,其中甘氨酸32残基由丝氨酸残基置换,天冬氨酸87残基由甘氨酸残基置换,缬氨酸92残基由丙氨酸残基置换,或甘氨酸127残基由精氨酸残基置换,或它们的组合。

7. 根据权利要求1所述的可溶性AXL变体多肽,其中所述AXL变体包含相对于所述野生型AXL序列(SEQ ID NO:1)在以下位置的氨基酸改变:(a) 谷氨酸26;(b) 缬氨酸79;(c) 缬氨酸92;和(d) 甘氨酸127。

8. 根据权利要求1所述的可溶性AXL变体多肽,其中谷氨酸26残基由甘氨酸残基置换,缬氨酸79残基由蛋氨酸残基置换,缬氨酸92残基由丙氨酸残基置换,或甘氨酸127残基由精氨酸残基置换,或它们的组合。

9. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的一种或多种权利要求1所述的可溶性AXL变体多肽或其药学上可接受的盐。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物,其进一步包含至少一种细胞毒剂或药学上可接受的赋形剂或其组合。

## 抗转移疗法中AXL信号传导的抑制

[0001] 本申请为2011年1月21日提交的名称为“抗转移疗法中AXL信号传导的抑制”的中国专利申请No.201180014940.0的分案申请。本发明要求2010年1月22日提交的美国临时申请第61/336,478号的优先权,所述临时申请案的内容以引用的方式明确地并入本文。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及肿瘤侵袭和转移,例如经由与AXL和/或GAS6相关的途径治疗或诊断肿瘤侵袭或转移。

### 背景技术

[0003] 侵袭和转移是癌症最具隐匿性和生命威胁性的方面。虽然具有极少侵袭或无侵袭的肿瘤可被成功清除,但一旦赘生物变得具有侵袭性,它就可经由淋巴系统和/或血管沟散布到多个部位,并且使完全清除变得非常困难。侵袭和转移通过两个过程杀死宿主:局部侵袭以及远端器官定植和损伤。局部侵袭可通过局部压迫、局部破坏或妨碍正常器官功能而损害受累组织的功能。然而,癌症中最显著的转折点是形成远端转移。此时,患者不再能单独地用局部疗法治愈。

[0004] 转移过程是一连串涉及多种宿主-肿瘤相互作用的相关连续步骤。该复杂过程需要细胞进入血管或淋巴循环中,在远端血管或淋巴床处停滞,主动外渗到器官间质组织和实质中,并且增殖成次级群落。转移潜力受局部微环境、血管生成、基质-肿瘤相互作用、局部组织对细胞因子的加工以及肿瘤和宿主细胞的分子表型的影响。

[0005] 局部微侵袭可在早期发生,即使远端散布可能不明显或可能尚未发生。肿瘤细胞在原位转变成侵袭性癌期间穿透上皮基底膜且进入下层间质。一旦肿瘤细胞侵袭下层基质,其便进入淋巴系统和血管进行远端散布,同时释放基质片段和生长因子。在从开始转变成侵袭性癌期间,上皮基底膜的组织、分布和量发生整体和广泛的改变。

[0006] 癌症预防和治疗方面的治疗工作集中在信号传导途径或选择性调节蛋白的层面上。蛋白激酶活性、钙稳态和肿瘤蛋白激活是驱动信号且因此可为治疗干预的关键调节位点。信号传导途径中调节侵袭和血管生成的激酶可为转移的重要调节因子。生物化学分子靶的最大类别之一是受体酪氨酸激酶(RTK)家族。迄今最常见的受体酪氨酸激酶分子靶是EGF和血管内皮生长因子(VEGF)受体。较新的激酶分子靶包括III型RTK家族的c-kit和abl。这些分子的抑制剂已与经典化疗剂组合施用。

[0007] 转移是最终引起发生大量癌症病痛和死亡的原因。需要识别和靶向对转移性癌细胞进行识别且产生针对这些癌细胞的特异性抑制的试剂的分子和功能标志物。

[0008] 本领域的出版物尤其包括Li等,Oncogene.(2009) 28 (39):3442-55;Ullrich等的美国专利申请20050186571;Bearss等的美国专利申请20080293733;Sun等,Oncology.2004;66 (6):450-7;Gustafsson等,Clin Cancer Res.(2009) 15 (14):4742-9;Wimmel等,Eur J Cancer.2001 37 (17):2264-74;Koorstra等,Cancer Biol Ther.2009 8 (7):618-26;Tai等,Oncogene.(2008) 27 (29):4044-55

[0009] 受体酪氨酸激酶AXL(也称作Ufo和Tyro7)属于酪氨酸受体家族,这一家族还包括Tyro3(Sky)和Mer(Tyro1 2)。AXL家族的常见配体是GAS6(生长停滞特异蛋白6)。人AXL是能够引导894-氨基酸多肽的合成的2,682-bp开放阅读框。已表征两种变体mRNA,转录变体1可以Genbank NM\_021913.3登录且转录变体2可以NM\_001699.4登录。天然蛋白的多肽序列以SEQ ID NO:1提供,且关于氨基酸修饰可特定参考这一序列。GAS6/AXL的重要细胞功能包括细胞粘附、迁移、吞噬和抑制细胞凋亡。GAS6和AXL家族受体以组织和疾病特异性方式受到高度调节。

[0010] AXL的特征在于其独特的分子结构,因为胞内区具有受体酪氨酸激酶的典型结构,且胞外域含有纤连蛋白III和Ig基序,类似于钙粘蛋白型粘附分子。在发育期间,AXL在包括脑在内的多种器官中表达,表明这种RTK涉及间充质和神经发育。在成体中,AXL表达较低,但在多种肿瘤中会恢复高表达水平。迄今为止,GAS6是AXL的单一激活配体。

[0011] 受体酪氨酸激酶(RTK)通常通过促进受体二聚并且又促进胞浆域内酪氨酸残基的自身磷酸化的配体而激活。信号传导蛋白与这些磷酸化酪氨酸残基的结合接着引起下游信号传导。AXL家族RTK的独特之处在于其由GAS6激活,GAS6是维生素K依赖性蛋白家族的成员,它类似于凝血因子而非典型生长因子。

## 发明内容

[0012] 本发明部分是基于以下发现,即AXL和/或GAS6相关途径与肿瘤侵袭和/或转移有关。因此,本发明提供可用于例如经由抑制AXL和/或GAS6相关途径来治疗肿瘤侵袭和/或转移的组合物和方法。此外,本发明提供可用于例如经由检测AXL和/或GAS6的活性水平来确定肿瘤变得具有侵袭性和/或转移性的易发性或可能性的试剂和方法。

[0013] 在一个实施方案中,本发明提供可溶性AXL变体多肽,其中所述多肽缺乏AXL跨膜域,任选地缺乏胞内域并且相对于野生型AXL序列包含至少一个氨基酸修饰,且其中所述改变增加AXL多肽结合于GAS6的亲合力。在一些实施方案中,可溶性AXL变体多肽包含在野生型AXL序列(SEQ ID NO:1)的选自由以下组成的组的区域中的至少一个氨基酸修饰:1)在15-50之间,2)在60-120之间,和3)在125-135之间。在一些其它实施方案中,可溶性AXL变体多肽包含在野生型AXL序列(SEQ ID NO:1)的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或129位的至少一个氨基酸修饰或其组合。在一些其它实施方案中,可溶性AXL变体多肽包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸修饰:1) A19T, 2) T23M, 3) E26G, 4) E27G或E27K, 5) G32S, 6) N33S, 7) T38I, 8) T44A, 9) H61Y, 10) D65N, 11) A72V, 12) S74N, 13) Q78E, 14) V79M, 15) Q86R, 16) D87G, 17) D88N, 18) I90M或I90V, 19) V92A、V92G或V92D, 20) I97R, 21) T98A或T98P, 22) T105M, 23) Q109R, 24) V112A, 25) F113L, 26) H116R, 27) T118A, 28) G127R或G127E, 和29) E129K,以及它们的组合和保守等效物。

[0014] 在一些其它实施方案中,可溶性AXL变体多肽包含相对于野生型AXL序列(SEQ ID NO:1)在以下位置的氨基酸改变:(a) 甘氨酸32;(b) 天冬氨酸87;(c) 缬氨酸92;和(d) 甘氨酸127。在一些其它实施方案中,可溶性AXL变体多肽包含由丝氨酸残基置换的甘氨酸32残基、由甘氨酸残基置换的天冬氨酸87残基、由丙氨酸残基置换的缬氨酸92残基、或由精氨酸残基置换的甘氨酸127残基或其组合或保守等效物。在一些其它实施方案中,可溶性AXL变体

多肽包含相对于野生型AXL序列 (SEQ ID NO:1) 在以下位置的氨基酸改变: (a) 谷氨酸26; (b) 缬氨酸79; (c) 缬氨酸92; 和 (d) 甘氨酸127。在一些其它实施方案中,可溶性AXL变体多肽包含由甘氨酸残基置换的谷氨酸26残基、由蛋氨酸残基置换的缬氨酸79残基、由丙氨酸残基置换的缬氨酸92残基、或由谷氨酸残基置换的甘氨酸127残基或它们的组合或保守等效物。

[0015] 在一些其它实施方案中,可溶性AXL变体多肽至少包含野生型AXL多肽 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸1-437、19-437、130-437、19-132、1-132。在一些其它实施方案中,可溶性AXL变体多肽是包含Fc域的融合蛋白。

[0016] 在一个实施方案中,可溶性AXL变体多肽对GAS6的亲合力为至少约 $1 \times 10^{-5}$ M。在另一实施方案中,可溶性AXL变体多肽对GAS6的亲合力为至少约 $1 \times 10^{-6}$ M。在另一实施方案中,可溶性AXL变体多肽对GAS6的亲合力为至少约 $1 \times 10^{-7}$ M。在另一实施方案中,可溶性AXL变体多肽对GAS6的亲合力为至少约 $1 \times 10^{-8}$ M。在另一实施方案中,可溶性AXL变体多肽对GAS6的亲合力为至少约 $1 \times 10^{-9}$ M、 $1 \times 10^{-10}$ M、 $1 \times 10^{-11}$ M或 $1 \times 10^{-12}$ M。在本文所述的各种实施方案中,可溶性AXL变体多肽展现的对GAS6的亲合力为野生型AXL多肽的亲合力的至少约2倍。在一些实施方案中,可溶性AXL变体多肽展现的对GAS6的亲合力比野生型AXL多肽的亲合力强为至少约3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍或30倍。

[0017] 在另一实施方案中,本发明提供特异性结合于GAS6蛋白 (SEQ ID NO:2) 的分离的抗体或其片段。在一些实施方案中,分离的抗体或其片段是单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体 (ScFv) 或其组合。在一些其它实施方案中,分离的抗体或其片段结合GAS6的一个或多个氨基酸区域中所包含的表位,所述氨基酸区域选自由R299-T317、V364-P372、R389-N396、D398-A406、E413-H429和W450-M468组成的组。在一些其它实施方案中,分离的抗体或其片段结合选自由以下组成的组的氨基酸区域中所包含的表位: 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) 和WLNGETTTIQETVKVNTRM (SEQ ID NO:8)。

[0018] 在另一实施方案中,本发明提供治疗、减轻或预防哺乳动物患者中的肿瘤转移或侵袭的方法。在一个实施方案中,所述方法包括对所述患者施用有效剂量的可溶性AXL变体多肽或分离的抗GAS6抗体或其片段。

[0019] 在另一实施方案中,本发明提供治疗、减轻或预防哺乳动物患者中的肿瘤转移或侵袭的方法。在一个实施方案中,所述方法包括施用一种或多种选自由以下组成的组的抑制剂: (a) AXL活性抑制剂, (b) GAS6活性抑制剂, 和 (c) AXL-GAS6相互作用抑制剂。在本文所述的各种实施方案中,所述抑制剂是多肽、多核苷酸、小分子、抗体、抗体片段或抗体药物缀合物。

[0020] 在另一实施方案中,本发明提供确定肿瘤在受试者体内进行侵袭或转移的能力的方法。在一个实施方案中,所述方法包括检测来自具有肿瘤的受试者的生物样品中AXL活性和/或GAS6活性的水平; 和将所述生物样品中AXL和/或GAS6活性的水平与预定水平相比较, 其中超出预定水平的增加可指示肿瘤发生侵袭或转移的倾向。

## 附图说明

[0021] 图1. AXL表达与人类乳腺癌和卵巢癌中的肿瘤进展和转移相关。A. 正常乳房组织(正常)、原发浸润性导管癌(1级、2级和3级)和淋巴结转移(淋巴结)中的AXL免疫组织化学染色的代表性图像。注意,高水平的膜AXL染色出现于2级(箭头)、3级和淋巴结转移中。正常或肿瘤基质中未观察到AXL染色(\*)。B. 正常卵巢上皮(箭头)、II期、III期和来源于浆液性腺癌患者的网膜转移的AXL免疫组织化学染色的代表性图像。注意,正常基质和肿瘤基质对于AXL染色呈阴性(\*)。

[0022] 图2. AXL的遗传失活足以阻断乳房和卵巢转移。A. 尾静脉注射shscramble (shSCRM) 和shAXL (shAXL) MDA-231细胞的小鼠的肺中的H&E和AXL免疫组织化学染色。照片表示每组5只小鼠。图形描绘注射shSCRM或shAXL MDA-231细胞的小鼠的全肺中人GASPDH和AXL表达的实时PCR分析(n=5)。B. 注射shscramble (shSCRM) 和shAXL (shAXL) SKOV3ip.1细胞后28天对小鼠拍摄的照片。注意,注射shSCRM的小鼠在整个腹腔中形成大量转移(圆圈)。对于shAXL组,显示具有最大肿瘤负荷的小鼠。右边的图形描绘每只小鼠>5mm尺寸的腹膜转移的平均数目和最大肿瘤的平均重量。照片表示每组5只小鼠。C. 注射shSCRM和shAXL OVCAR-8细胞后34天对小鼠拍摄的照片。注意,注射shSCRM的小鼠在整个腹腔中形成大量转移(圆圈)。右边的图形描绘每只小鼠腹膜转移的平均总数和平均总肿瘤重量。照片表示每组8只小鼠。

[0023] 图3. AXL的遗传失活不会影响乳房或卵巢肿瘤细胞的体外增殖或体内生长。A. 稳定表达scramble对照(shSCRM)或AXL(shAXL)的shRNA靶向序列的MDA-231、SKOV3ip.1和OVCAR-8细胞的细胞生长曲线。一式三份进行测量且误差条线表示S.E.M。B. 48天疗程内生长的常位MDA-231(n=每组8只小鼠)和皮下SKOV3ip.1肿瘤(n=每组4只小鼠)的平均肿瘤体积。误差条线表示S.E.M。

[0024] 图4. AXL在体外调节卵巢和乳房肿瘤细胞的侵袭。A. 对照(shSCRM)和AXL缺陷(shAXL)MDA-231、SKOV3ip.1和OVCAR-8细胞的胶原蛋白侵袭测定。照片表示每组3个样品且在细胞接种于胶原蛋白后7天拍摄。注意,与AXL缺陷细胞(圆形)相比,在AXL野生型细胞(分枝)中观察到侵袭性表型。图形显示胶原蛋白侵袭测定的量化。B. shAXL和shSCRM SKOV3ip.1细胞中MMP-2表达的实时PCR分析。表达值归一化为18S;n=3。误差条线表示S.E.M。星号指示与shSCRM相比表达显著增加或降低,如由斯氏t检验(student's t-test)(\*\* ,P<0.001)所测定。C. shSCRM或shAXL SKOV3ip.1细胞的MMP-2报告基因测定(n=6)。D. 从血清饥饿SKOV3ip.1细胞收集的条件培养基中MMP2酶原和活性MMP2活性的明胶酶谱法测定。E. 表达靶向scramble对照(shSCRM)或AXL(shAXL)的shRNA序列的SKOV3ip.1细胞和用GAS6或PI3K抑制剂Ly294002(Ly)和GAS6处理的饥饿SKOV3ip.1细胞(strve)中Ser473处的磷酸化AKT(P-AKT)、总AKT(AKT)和AXL表达的蛋白质印迹分析。F. 用GAS6或GAS6和PI3K抑制剂Ly294002(Ly+GAS6)处理的饥饿SKOV3ip.1细胞(strve)的MMP-2报告基因测定。

[0025] 图5. 可溶性AXL胞外域疗法在体外抑制AXL信号传导和侵袭。A. 可溶性AXL疗法的机制的示意图。可溶性AXL(sAXL)充当诱饵受体以抑制内源性AXL信号传导。B. 表达靶向scramble对照(shSCRM)或AXL(shAXL)的shRNA序列的MDA231、SKOV3ip.1和OVCAR-8细胞和用GAS6或PI3K抑制剂Ly294002(Ly)和GAS6处理的饥饿SKOV3ip.1细胞(strve)中Ser473处的磷酸化AKT(P-AKT)、总AKT(AKT)和AXL表达的蛋白质印迹分析。C. 用含有可溶性AXL受体(sAXL)的条件培养基或对照培养基(-)处理的细胞中磷酸化AKT Ser473表达的蛋白质印迹

分析。使所有细胞饥饿48小时且用GAS6(+)或媒介物(-)处理。D.用含有对照载体或sAXL的条件培养基处理的MDA-231细胞中的胶原蛋白侵袭测定。

[0026] 图6.用可溶性AXL受体治疗会抑制确知有转移的小鼠中的转移性肿瘤负荷。A.可溶性AXL受体治疗研究的示意图。向裸小鼠腹膜内(i.p.)注射 $1 \times 10^6$ 个SKOV3ip.1细胞。移植后5天,在小鼠中检验到肉眼可见的病变的存在(显示注射后第5天具有腹膜转移的小鼠的代表性照片,转移性病变由圆圈表示)。在第7天,向小鼠注射表达IgG2a-Fc对照(Ad-Fc)或可溶性AXL受体(Ad-sAXL)的腺病毒。腺病毒注射后,每3-4天通过蛋白质印迹分析评估血清sAXL表达水平。肿瘤细胞移植后第28天,在所有小鼠中评估肿瘤负荷。B.在肿瘤细胞注射后28天,用表达Ad-sAXL或Ad-Fc的腺病毒治疗的小鼠的代表性照片。转移性病变由圆圈表示。图形显示每组7只小鼠的平均总肿瘤数目和重量。误差条线表示S.E.M.。注意,肿瘤数目和重量的统计差( $p=0.01$ ,斯氏t检验)在Ad-Fc和Ad-sAXL治疗的小鼠之间观察到(\*)。C.用Ad-Fc或Ad-AXL治疗的小鼠的肿瘤中MMP-2表达的实时PCR分析。

[0027] 图7.可溶性AXL胞外域疗法不会诱导正常组织毒性。A.用对照(Fc)或可溶性AXL疗法(sAXL)治疗的小鼠的完整的全血细胞计数(Complete CBC)和血清化学分析。B.从用Fc或sAXL治疗的小鼠收集的肝脏和肾组织的H&E染色。

[0028] 图8.说明与转移的可溶性AXL受体抑制作用相关的分子机制的示意图。可溶性AXL受体(sAXL)疗法充当结合于AXL配体GAS6的诱饵受体。sAXL抑制刺激细胞侵袭和转移的内源性GAS6-AXL信号传导事件。

[0029] 图9.AXL缺陷型乳癌和卵巢癌细胞系的产生。A.一组人类乳癌和卵巢癌细胞系中AXL表达的蛋白质印迹分析。热休克蛋白70(Hsp70)用作蛋白负载对照。B.由scramble对照(shSCRM)或AXL(shAXL)的shRNA靶向序列稳定转染的转移性乳癌细胞系(MDA-231)、卵巢癌细胞系(SKOV3ip.1和OVCAR-8)中AXL表达的蛋白质印迹分析。注意,shAXL细胞系在AXL表达方面显著降低。

[0030] 图10.AXL不会影响乳房和卵巢肿瘤细胞粘附或存活。A-B.在针对作为化学引诱物的血清的博伊登室迁移测定(boyden chamber migration assay)中MDA-231(A)和SKOV3ip.1(B)细胞的细胞迁移百分比。C-D.MDA-231(A)、SKOV3ip.1(B)细胞粘附于胞外基质蛋白的情形的分析。缩写:牛血清白蛋白(BSA),纤连蛋白(FN),I型胶原蛋白(Co1 I),IV型胶原蛋白(Co1 IV),层粘连蛋白(LN),纤维蛋白原(FBN)。误差条线表示平均值的标准误差。E-F.撤血清后AXL野生型和AXL缺陷型MDA-231肿瘤细胞(E)和SKOV3ip.1肿瘤细胞(F)的存活分析,如XTT测定所测定。

[0031] 图11.用可溶性AXL受体治疗会抑制产生OVCAR-8转移的小鼠中的转移性肿瘤负荷。A.可溶性AXL受体治疗研究的示意图。向裸小鼠腹膜内注射 $5 \times 10^6$ 个OVCAR-8细胞。移植后14天,在小鼠中检验到肉眼可见的病变的存在(显示注射后第14天具有腹膜转移的小鼠的代表性照片,转移性病变由圆圈表示)。在第14天,向小鼠注射表达IgG2a-Fc对照(Ad-Fc)或可溶性AXL受体(Ad-sAXL)的腺病毒。通过蛋白质印迹分析评估血清sAXL表达水平。肿瘤细胞移植后第34天,在所有小鼠中评估肿瘤负荷。B.在肿瘤细胞注射后28天,用表达Ad-sAXL或Ad-Fc的腺病毒治疗的小鼠的代表性照片。转移性病变由圆圈表示。C.图形显示每组8只小鼠的平均总肿瘤数目和重量。误差条线表示S.E.M.。注意,肿瘤数目和重量的统计差( $p<0.01$ ,斯氏t检验)在Ad-Fc和Ad-sAXL治疗的小鼠之间观察到(\*)。

[0032] 图12A和图12B. AXL库第5轮分选产物结合于GAS6。图12A表示表达野生型AXL (A) 或从定向进化处理汇集的AXL第5轮分选产物 (B) 的酵母细胞的流式细胞术点图。数据显示如实例2中所述的解离速率测试后的结合。结合于2nM Gas6的水平显示于左侧柱形图中, 4小时无结合步骤后结合于Gas6的水平显示于中间柱形图中, 且6小时无结合步骤后结合于Gas6的水平显示于右侧柱形图中。图12B表示其细胞表面上特定蛋白的表达呈阳性的细胞 (各流式细胞术点图的右上象限) 结合于Gas6的水平 (y轴) 的量化。汇集的第5轮分选产物显示与野生型AXL相比显著提高的Gas6结合。

[0033] 图13. 增强的AXL变体与GAS6的结合。左图显示与野生型AXL (绿色圆形) 相比, AXL 突变体S6-1 (红色方形) 和S6-2 (蓝色菱形) 针对Gas6的平衡结合。突变体S6-1和S6-2展现以显著较高水平结合于较低浓度的Gas6, 表明与野生型AXL相比这些突变体具有较强的结合亲和力。右图显示野生型或工程改造过的Gas6-AXL相互作用的解离动力学。野生型Gas6-AXL相互作用 (“野生型”) 随时间快速解离, 而Gas6与S6-1 (“S6-1”) 或S6-2 (“S6-2”) 之间工程改造过的相互作用显示显著增加的结合保持性。

[0034] 图14. 纯化过的AXL S6-1-Fc的腹膜内递送显示相比野生型AXL-Fc和AXL E59R/T77R-Fc增强的治疗作用。显示来自3个治疗组 (AXL E59R/T77R-Fc、野生型AXL-Fc和AXL S6-1-Fc) 的小鼠的尸检的2个代表性图像。黑色圆圈指示图像中可见的转移性病变, 但不一定指示所有转移位点。野生型AXL-Fc显示出对转移的中度抑制作用 (相比阴性对照AXL E59R/T77R), 而AXL S6-1显示出对转移的几乎完全抑制作用。

[0035] 图15. SKOV3ip.1异种移植模型中转移的抑制作用。在上部两个图形中, 同一数据集以两种不同方式提供以指示每个治疗组中计数的转移性病变的平均数目。同样, 下部两个图形也显示同一数据集, 这个数据集概述了从每个治疗组中的小鼠切除的所有转移的总重量。与阴性对照E59R/T77R-Fc相比, 野生型AXL-Fc抑制转移的扩散, 如病变数目 (上图) 以及总重量 (下图) 的减少所指示。AXL S6-1-Fc显示与野生型AXL-Fc和AXL E59R/T77R-Fc相比肿瘤负荷显著减少, 如通过病变数目 (上图) 以及总重量 (下图) 所评估。这些数据表明增强的AXL S6-1亲和力提供与野生型相比改进的治疗功效, 且AXL S6-1-Fc是用于管理转移的可行性治疗。

## 具体实施方式

### [0036] 定义

[0037] 在以下描述中, 广泛利用在细胞培养领域中惯用的多个术语。为了对本说明书和权利要求书以及将要赋予这些术语的范围有清楚且一致的理解, 提供以下定义。

[0038] 转移性细胞的AXL或其配体GAS6的“抑制剂”、“活化剂”和“调节剂”分别用于指使用体外和体内测定针对受体或配体结合或信号传导所识别的抑制、激活或调节分子, 例如配体、受体、激动剂、拮抗剂和其同系物和模拟物。

[0039] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用, 是指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物, 以及适用于天然存在氨基酸聚合物和非天然存在氨基酸聚合物。

[0040] 术语“氨基酸”是指天然存在和合成氨基酸, 以及以类似于天然存在氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸, 以



及随后进行修饰的氨基酸,例如羟基脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在氨基酸具有相同的基本化学结构,即 $\alpha$ 碳结合于氢、羧基、氨基和R基团的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基硫。此类类似物具有修饰过的R基团(例如正亮氨酸)或修饰过的肽骨架,但保持与天然存在氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但以类似于天然存在氨基酸的方式起作用的化合物。本发明中用于表示氨基酸的所有单字母都是根据本领域中常规使用的公认氨基酸符号来使用,例如A意指丙氨酸,C意指半胱氨酸等。由相关位置之前和之后的单字母表示的氨基酸反映原始氨基酸(所述位置之前)改变为改变后的氨基酸(位置之后)。例如,A19T意指19位的氨基酸丙氨酸改变为苏氨酸。

[0041] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用,是指正接受治疗进行评估和/或正接受治疗的哺乳动物。在一实施方案中,哺乳动物是人。术语“受试者”、“个体”和“患者”因此涵盖患有癌症,包括不限于卵巢或前列腺的腺癌、乳癌、胶质母细胞瘤等的个体,包括已接受切除术(手术)以清除癌组织或为切除术(手术)候选者的个体。受试者可以是人,但也可包括其它哺乳动物,特别是适用作人类疾病的实验室模型的哺乳动物,例如小鼠、大鼠等。

[0042] 本文所用的术语“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖(无论恶性或良性),以及所有癌前和癌细胞和组织。

[0043] 术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”在本文中可互换使用,是指细胞展现自主、未调节的生长,使得细胞展现异常生长表型,其特征显著丧失对细胞增殖的控制。一般来说,本申请案中用于检测、分析、分类或治疗的相关细胞包括癌前(例如良性)、恶性、转移前、转移性和非转移性细胞。癌症的实例包括但不限于卵巢癌、胶质母细胞瘤、乳癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、肝细胞癌、胃癌、胰腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、甲状腺癌、肾癌、癌瘤、黑色素瘤、头颈癌和脑癌。

[0044] 癌症的“病理学”包括所有危及患者健康的现象。这一病理学包括不限于异常或不可控制的细胞生长、转移、干扰相邻细胞的正常功能、以异常水平释放细胞因子或其它分泌产物、抑制或加重发炎或免疫反应、瘤形成、初癌、恶性肿瘤、侵袭周围或远端组织或器官(诸如淋巴结)等。

[0045] 本文所用的术语“癌症复发”和“肿瘤复发”和其语法变体是指癌症诊断后赘生性细胞或癌细胞的进一步生长。具体而言,复发可在癌组织中存在进一步癌细胞生长时发生。“肿瘤扩散”同样在肿瘤细胞散布到局部或远端组织和器官中时发生;因此,肿瘤扩散涵盖肿瘤转移。“肿瘤侵袭”在肿瘤生长局部扩散开以通过压迫、破坏或妨碍正常器官功能危及受累组织的功能时发生。

[0046] 本文所用的术语“转移”是指癌性肿瘤在未与原始癌性肿瘤的器官直接连接的器官或身体部分中的生长。转移应理解为包括微转移,微转移是未直接连接于原始癌性肿瘤的器官的器官或身体部分中存在不可检测的量的癌细胞。转移也可定义为进程的若干步骤,诸如癌细胞从原始肿瘤位点偏离,和癌细胞迁移到和/或侵袭身体其它部分。因此,本发明预期一种确定未直接连接于原始癌性肿瘤的器官的器官或身体部分中一个或多个癌性肿瘤的进一步生长风险的方法,和/或导致这种生长的进程中的任何步骤。

[0047] 根据癌症的性质,获得适当患者样品。本文所用的短语“癌组织样品”是指从癌性

肿瘤获得的任何细胞。就还未转移的实体肿瘤而言,将通常由手术清除的肿瘤获得组织样品且准备通过常规技术进行测试。

[0048] 该定义涵盖生物学来源的血液和其它液体样品、实体组织样品,例如活检标本或组织培养物或源于其的细胞和其后代。该定义还包括已在获得后以任何方式操作,诸如用试剂处理、经过洗涤或富集某些细胞群体(诸如癌细胞)的样品。该定义还包括已富集特定分子类型(例如核酸、多肽等)的样品。术语“生物样品”涵盖临床样品,并且还包括通过手术切除术获得的组织、通过活检获得的组织、培养的细胞、细胞上清液、细胞裂解液、组织样品、器官、骨髓、血液、血浆、血清等。“生物样品”包括从患者的癌细胞获得的样品,例如从患者的癌细胞获得的包含多核苷酸和/或多肽的样品(例如细胞裂解液或包含多核苷酸和/或多肽的其它细胞提取物);和来自患者的包含癌细胞的样品。来自患者的包含癌细胞的生物样品也可包括非癌细胞。

[0049] 术语“诊断”在本文中用于指识别分子或病理状态、疾病或病况,诸如识别乳癌、前列腺癌或其它癌症类型的分子亚型。

[0050] 术语“预后”在本文中用于指预计癌症可造成的死亡或进展(包括复发、转移性扩散和药物抗性)、赘生性疾病(诸如卵巢癌)的可能性。术语“预计”在本文中用于指基于观察、经验或科学推理进行预测或估计的行为。在一个实例中,医师可预计在手术清除原发性肿瘤和/或化学疗法后一段时间内无癌症复发时患者存活的可能性。

[0051] 本文所用的术语“治疗”及类似用语是指施用药剂或进行操作(例如放射、手术操作等)以获得效果。所述效果就完全或部分预防疾病或其症状来说可以是预防性的,和/或就实现疾病和/或疾病症状的部分或完全治愈来说可以是治疗性的。本文所用的“治疗”涵盖哺乳动物(特别是人)体内任何转移性肿瘤的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病或疾病症状在可倾向于患有所述疾病但尚未诊断出患有所述疾病(例如包括可与原发性疾病有关或由原发性疾病引起的疾病)的受试者中发生;(b)抑制疾病,即使其发展停滞;和(c)减轻疾病,即使疾病消退。在肿瘤(例如癌症)治疗中,治疗剂可直接减少肿瘤细胞的转移。

[0052] 治疗可指成功治疗或改善或预防癌症的任何指标,包括任何客观或主观参数,诸如缓和;缓解;减少症状或使疾病病况更能为患者所忍受;减慢退化或衰退速率;或使退化终点较弱。症状的治疗或改善可基于客观或主观参数;包括医师检查结果。因此,术语“治疗”包括施用本发明化合物或药剂以预防或延迟、减轻或停滞或抑制与瘤形成相关的症状或病况(例如肿瘤或癌症)的发展。术语“治疗作用”是指减轻、消除或预防受试者的疾病、疾病症状或疾病副作用。

[0053] 在某些实施方案中,“与……组合”、“组合疗法”和“组合产物”是指对患者并行施用第一治疗剂和本文所用的化合物。当组合施用,各组分可同时或在不同时间点以任何顺序相继施用。因此,各组分可分别施用,但时间充分接近以便提供所需治疗作用。

[0054] 根据本发明,第一治疗剂可为任何适合的治疗剂,例如细胞毒剂。细胞毒剂的一个示例性种类是化学治疗剂,例如它们可与治疗组合以抑制AXL或GAS6信号传导。示例性化学治疗剂包括但不限于阿地白介素(aldesleukin)、六甲蜜胺(altretamine)、氨磷汀(amifostine)、天冬酰胺酶、博来霉素(bleomycin)、卡培他滨(capecitabine)、卡波铂(carboplatin)、卡氮芥(carmustine)、克拉屈滨(cladribine)、西沙必利(cisapride)、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷(cytarabine)、氮烯咪胺(dacarbazine,DTIC)、放线菌素D

(dactinomycin)、多西他赛(docetaxel)、阿霉素(doxorubicin)、屈大麻酚(dronabinol)、倍癌霉素(duocarmycin)、阿法依泊汀( epoetin alpha)、依托泊苷(etoposide)、非格司亭(filgrastim)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、格拉司琼(granisetron)、羟基脲、伊达比星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、干扰素 $\alpha$ (interferon alpha)、伊立替康(irinotecan)、兰索拉唑(lansoprazole)、左旋咪唑(levamisole)、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、甲地孕酮(megestrol)、美司钠(mesna)、甲氨蝶呤(methotrexate)、甲氧氯普胺(metoclopramide)、丝裂霉素(mitomycin)、米托坦(mitotane)、米托蒽醌(mitoxantrone)、奥美拉唑(omeprazole)、恩丹西酮(ondansetron)、紫杉醇(paclitaxel, Taxol<sup>TM</sup>)、毛果芸香碱(pilocarpine)、普鲁氯嗪(prochloroperazine)、利妥昔单抗(rituximab)、肥皂草素(saproin)、他莫西芬(tamoxifen)、紫衫酚(taxol)、盐酸拓扑替康(topotecan hydrochloride)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、长春花碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)和酒石酸长春瑞滨(vinorelbine tartrate)。对于卵巢癌治疗,可与AXL或GAS6信号传导抑制剂组合的优选化学治疗剂是紫杉醇(Taxol<sup>TM</sup>)。

[0055] 其它组合疗法是放射、手术和激素剥夺(Kwon等, Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A., 96:15074-9, 1999)。血管生成抑制剂也可与本发明方法组合。

[0056] 已知癌症治疗药物与本发明药物组合物的“相伴施用”意指在使得已知药物与本发明组合物均具有治疗作用的时间施用所述药物与AXL抑制剂。所述相伴施用可包括相对于本发明化合物的施用并行(即同时)、预先或随后施用所述药物。本领域技术人员将不难确定施用特定药物和本发明组合物的适当时间选择、顺序和剂量。

[0057] 本文所用的短语“无疾病存活”是指缺乏此类肿瘤复发和/或扩散,和诊断后患者的命运(关于癌症对患者寿命的影响)。短语“总体存活”是指诊断后患者的命运,即使患者死因可能不是直接由癌症影响引起。短语“无疾病存活的可能性”、“复发风险”和其变体是指癌症诊断后患者体内肿瘤复发或扩散的概率,其中所述概率是根据本发明方法确定。

[0058] 本文所用的术语“相关”或“与……相关”和类似术语是指两个事件的情形之间的统计关联,其中事件包括数字、数据集等。例如,当事件涉及数字时,正相关(本文中又称作“直接相关”)意指随着一个数字增加,另一数字也增加。负相关(本文中又称作“逆相关”)意指随着一个数字增加,另一数字减少。

[0059] “剂量单位”是指适合作为剂量单位用于欲治疗的特定个体的物理上分立的单元。各单元可含有预定量的活性化合物,所述量经过计算以与所需药物载体联合产生所要治疗作用。关于剂量单位形式的规格可取决于(a)活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗作用,和(b)本领域中混配所述活性化合物所固有的限制。

[0060] “药学上可接受的赋形剂”意指适用于制备药物组合物的通常是安全、无毒和合乎需要的赋形剂,且包括可接受用于兽医学使用以及人类药物使用的赋形剂。所述赋形剂可为固体、液体、半固体或在气雾剂组合物的情形下为气态。

[0061] “药学上可接受的盐和酯”意指药学上可接受且具有所需药理学性质的盐和酯。此类盐包括其中化合物中存在的酸性质子能够与无机或有机碱反应而可形成的盐。适合的无机盐包括由碱金属(例如钠和钾、镁、钙和铝)形成的盐。适合的有机盐包括由有机碱,诸如胺碱(例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、缓血酸胺、N甲基葡糖胺等)形成的盐。此类盐也包

括由无机酸(例如盐酸和氢溴酸)和有机酸(例如乙酸、柠檬酸、顺丁烯二酸,以及烷烃-和芳烃-磺酸,诸如甲烷磺酸和苯磺酸)形成的酸加成盐。药学上可接受的酯包括由化合物中存在的羧基、磺酰氧基和膦酰氧基形成的酯,例如C<sub>1-6</sub>烷基酯。当存在两个酸性基团时,药学上可接受的盐或酯可为单酸-单盐或酯,或二盐或酯;且类似地,当存在两个以上酸性基团时,此类基团中的一些或全部可盐化或酯化。本发明中所命名的化合物可以未盐化或未酯化形式存在,或以盐化和/或酯化形式存在,且此类化合物的命名意图包括原始(未盐化和未酯化)化合物和其药学上可接受的盐和酯。另外,本发明中所命名的某些化合物可以一种以上立体异构形式存在,且所述化合物的命名意图包括所有单一立体异构体和此类立体异构体的所有混合物(外消旋或其它形式)。

[0062] 术语“药学上可接受的”、“生理学上可耐受的”和其语法变体在指组合物、载体、稀释剂和试剂时可互换使用且表示这些物质能够对人施用或施用于人体,而不会产生将禁止施用所述组合物程度的不利生理效应。

[0063] “治疗有效量”意指当施用于受试者以治疗疾病时足以治疗所述疾病的量。

[0064] 详述

[0065] 根据本发明,其提供可溶性AXL变体,例如与GAS6的结合活性基本上等于或优于野生型AXL多肽的结合活性的可溶性AXL变体多肽。在本发明的一些实施方案中,将可溶性AXL变体多肽用作治疗剂。

[0066] AXL蛋白(参考天然序列SEQ ID NO:1)包含来自残基27-128的免疫球蛋白(Ig)样域、来自残基139-222的第二Ig样域、来自残基225-332和333-427的纤连蛋白3型域、来自残基473-894的胞内域(包括酪氨酸激酶域)。779、821和866处的酪氨酸残基在受体二聚时自体磷酸化且充当胞内信号传导分子的停泊位点。用以释放可溶形式的多肽的天然裂解位点位于残基437-451处。

[0067] 出于本发明的目的,可溶形式的AXL是多肽中足够以可识别的亲合力(例如高亲合力)结合GAS6的部分,其通常位于信号序列与跨膜域之间,即一般来自约SEQ ID NO:1的残基19-437,但其可包含从约残基19、25、30、35、40、45、50到约残基132、450、440、430、420、410、400、375、350到321(例如残基19-132)的截短型式或主要由所述截短型式组成。在一些实施方案中,可溶形式的AXL缺乏跨膜域且任选地缺乏胞内域。

[0068] 本发明的可溶性AXL变体多肽(sAXL变体)包括一个或多个在可溶形式的野生型AXL内的氨基酸修饰,例如一个或多个增加其对GAS6的亲合力的氨基酸修饰。根据本发明,氨基酸修饰包括本领域中已知或以后发现的任何天然存在或人造氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰包括任何天然存在的突变,例如取代、缺失、添加、插入等。在一些其它实施方案中,氨基酸修饰包括用另一氨基酸(例如,现有氨基酸的保守等效物)置换现有氨基酸。在一些其它实施方案中,氨基酸修饰包括用非天然氨基酸置换一个或多个现有氨基酸,或插入一个或多个非天然氨基酸。在一些其它实施方案中,氨基酸修饰包括至少1、2、3、4、5或6或10个氨基酸突变或改变。

[0069] 在一些示范性实施方案中,一个或多个氨基酸修饰可用于改变可溶形式的AXL的性质,例如影响稳定性、结合活性和/或特异性等。对克隆基因进行体外诱变的技术是已知的。用于扫描突变的方案的实例可见于Gustin等, *Biotechniques* 14:22 (1993); Barany, *Gene* 37:111-23 (1985); Colicelli等, *Mol Gen Genet* 199:537-9 (1985); 和Prentki等,

Gene 29:303-13 (1984)。用于位点特异性诱变的方法可见于 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, 第 15.3-15.108 页; Weiner 等, *Gene* 126: 35-41 (1993); Sayers 等, *Biotechniques* 13:592-6 (1992); Jones 和 Winistorfer, *Biotechniques* 12:528-30 (1992); Barton 等, *Nucleic Acids Res* 18:7349-55 (1990); Marotti 和 Tomich, *Gene Anal Tech* 6:67-70 (1989); 和 Zhu *Anal Biochem* 177:120-4 (1989)。

[0070] 在一些实施方案中,本发明的 sAXL 变体包括在野生型 AXL (SEQ ID NO:1) 的残基 18 到 130、残基 10 到 135、残基 15 到 45、残基 60 到 65、残基 70 到 80、残基 85 到 90、残基 91 到 99、残基 104 到 110、残基 111 到 120、残基 125 到 130、残基 19 到 437、残基 130 到 437、残基 19 到 132、残基 21 到 132、残基 21 到 121、残基 26 到 132 或残基 26 到 121 的一个或多个区域中的一个或多个氨基酸修饰。在一些其它实施方案中,本发明的 sAXL 变体包括一个或多个在野生型 AXL (SEQ ID NO:1) 的残基 20 到 130、残基 37 到 124 或残基 141 到 212 中的一个或多个区域中的氨基酸修饰。在一些其它实施方案中,本发明的 sAXL 变体包括在野生型 AXL (SEQ ID NO:1) 的 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 或 129 位的一个或多个位置处的一个或多个氨基酸修饰。

[0071] 在一些其它实施方案中,本发明的 sAXL 变体包括一个或多个氨基酸修饰,包括但不限于 1) A19T, 2) T23M, 3) E26G, 4) E27G 或 E27K, 5) G32S, 6) N33S, 7) T38I, 8) T44A, 9) H61Y, 10) D65N, 11) A72V, 12) S74N, 13) Q78E, 14) V79M, 15) Q86R, 16) D87G, 17) D88N, 18) I90M 或 I90V, 19) V92A、V92G 或 V92D, 20) I97R, 21) T98A 或 T98P, 22) T105M, 23) Q109R, 24) V112A, 25) F113L, 26) H116R, 27) T118A, 28) G127R 或 G127E 和 29) E129K 及其组合。

[0072] 在一些其它实施方案中,本发明的 sAXL 变体包括在野生型 AXL (SEQ ID NO:1) 的 32、87、92 或 127 位的一个或多个氨基酸修饰或其组合,例如 G32S; D87G; V92A 和/或 G127R。在一些其它实施方案中,本发明的 sAXL 变体包括在野生型 AXL (SEQ ID NO:1) 的 26、79、92、127 位的一个或多个氨基酸修饰或其组合,例如 E26G、V79M; V92A 和/或 G127E。

[0073] 根据本发明,本发明的 sAXL 变体可进一步被修饰,例如接合于多种其它寡肽或蛋白质以达成多种目的。例如,可关于本发明的 sAXL 变体进行各种翻译后或表达后修饰。例如,通过采用适当编码序列,可提供法尼基化或异戊烯化。在一些实施方案中,本发明的 sAXL 变体可聚乙二醇化,其中聚氧乙烯基使得血流中的使用期增加。本发明的 sAXL 变体也可与其它蛋白(诸如 IgG 同型的 Fc, 其可与补体结合)、与毒素(诸如蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素等)或与允许靶向靶细胞上的特异性部分的特异性结合剂组合。

[0074] 在一些实施方案中,本发明的 sAXL 变体是融合蛋白,例如与第二多肽框内融合。在一些实施方案中,第二多肽能够增加融合蛋白的尺寸,例如使得融合蛋白将不会从循环中快速清除。在一些其它实施方案中,第二多肽是 Fc 区的一部分或全部。在一些其它实施方案中,第二多肽是实质上类似于 Fc 的任何适合多肽,例如提供增加的尺寸和/或与 Ig 分子的额外结合或相互作用。在一些其它实施方案中,第二多肽是白蛋白的一部分或全部,例如人血清白蛋白。

[0075] 在一些其它实施方案中,第二多肽适用于处理 sAXL 变体(例如纯化 sAXL 变体)或增加 sAXL 变体的体外或体内稳定性。例如,本发明的 sAXL 变体可与免疫球蛋白(IgG)的恒定域的部分组合,产生嵌合或融合多肽。这些融合蛋白有助于纯化且显示增加的体内半衰期。

一个已报道的实例描述了由人CD4-多肽的前两个域和哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链的恒定区的多个域组成的嵌合蛋白。EP A 394,827;Traunecker等,Nature,331:84-86,1988。与单独单体形式的分泌蛋白或蛋白片段相比,具有二硫键连接的二聚结构的融合蛋白(由于IgG)也可更高效结合和中和其它分子。Fountoulakis等,J.Biochem.270:3958-3964,1995。

[0076] 在一些其它实施方案中,第二多肽是标记序列,诸如有助于纯化融合多肽的肽。例如,标记氨基酸序列可为六组氨酸肽,诸如pQE载体(QIAGEN,Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,Calif.,91311)中提供的标签等,其中一些可商购获得。如Gentz等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-824,1989中所述,例如,六组氨酸便于纯化融合蛋白。另一适用于纯化的肽标签(“HA”标签)对应于来源于流感血凝素蛋白的表位。Wilson等,Cell 37:767,1984。

[0077] 在一些其它实施方案中,第二多肽是适用于改进本发明的sAXL变体的特征的实体。例如,额外氨基酸(特别是带电氨基酸)的区域可添加到多肽的N末端以改进从宿主细胞纯化或后续处理和储存期间的稳定性和持久性。另外,肽部分可添加到本发明的sAXL变体中以有助于纯化,且随后去除,接着最终制备多肽。有助于处理多肽的肽部分的添加是本领域中所熟悉的常规技术。

[0078] 在另一些实施方案中,本发明的sAXL变体与GAS6的结合活性至少等于或优于野生型AXL。在一些其它实施方案中,本发明的sAXL变体与GAS6的结合活性或亲和力比野生型AXL的结合活性或亲和力大至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或6倍。在一些其它实施方案中,本发明的sAXL变体与GAS6的结合活性或亲和力为至少约 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 或 $1 \times 10^{-9}$ M。在一些其它实施方案中,本发明的sAXL变体能够抑制、抑制或竞争野生型AXL与GAS6在体内、体外或体内和体外的结合。在一些其它实施方案中,本发明的sAXL变体抑制或竞争如本申请案实例2中所提供的AXL S6-1、AXL S6-2和/或AXL S6-5的结合。在一些其它实施方案中,本发明的sAXL变体抑制或竞争本申请案实例2中所提供的任何sAXL变体的结合。

[0079] 分子结合于GAS6的能力可例如通过假定配体结合于测定板上所涂布的GAS6的能力来确定。在一个实施方案中,本发明的sAXL变体与GAS6的结合活性可通过固定配体(例如GAS6)或sAXL变体来测定。例如,所述测定可包括将融合于His标签的GAS6固定于Ni激活的NTA树脂珠粒。试剂可添加于适当缓冲液中且珠粒在既定温度下孵育一段时间。在洗涤去除未结合的材料后,结合的蛋白可用例如SDS、具有高pH值的缓冲液等释放且加以分析。

[0080] 在其它实施方案中,本发明的sAXL变体的热稳定性优于野生型AXL的热稳定性。在一些实施方案中,本发明的sAXL变体的熔融温度比野生型AXL的熔融温度高至少5°C、10°C、15°C或20°C。

[0081] 根据本发明,本发明的sAXL变体也可包括一个或多个不改变本发明的sAXL变体的一级序列的修饰。例如,此类修饰可包括多肽的化学衍生化,例如乙酰化、酰胺化、羧化等。此类修饰也可包括糖基化修饰,例如通过在多肽的合成和加工期间或在其它加工步骤中修饰多肽的糖基化模式所产生的修饰;例如,通过将多肽暴露于影响糖基化的酶(诸如哺乳动物糖基化或去糖基化酶)所产生的修饰。在一些实施方案中,本发明的sAXL变体包括具有磷酸化氨基酸残基的sAXL变体,例如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸或磷酸苏氨酸。

[0082] 在一些其它实施方案中,本发明的sAXL变体包括如下sAXL变体,其进一步被修饰

以改进其对蛋白水解性降解的抗性或优化稳定性质或使其更适合作为治疗剂。例如,本发明的sAXL变体进一步包括含有不同于天然存在L-氨基酸的残基(例如D-氨基酸或非天然存在的合成氨基酸)的sAXL变体类似物。D-氨基酸可取代一些或所有氨基酸残基。

[0083] 在一些其它实施方案中,本发明的sAXL变体包括至少两个共价或非共价连接的同或不同sAXL变体。例如,在一些实施方案中,本发明的sAXL变体包括两个、三个、四个、五个或六个共价连接的同或不同sAXL变体,例如使得其将具有适当尺寸,但能避免不需要的聚集。

[0084] 根据本发明,本发明的sAXL变体可通过本领域中已知或以后发现的任何适合方式产生,例如由真核细胞或原核细胞产生,体外合成等。当所述蛋白是由原核细胞产生时,其可通过解折叠(例如热变性、DTT还原等)进一步加工且可进一步使用本领域中已知的方法再折叠。

[0085] 所述多肽可通过体外合成,使用本领域中已知的常规方法来制备。各种商业合成装置均可用,例如由Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA, Beckman)提供的自动化合成器等。通过使用所述合成器,天然存在的氨基酸可被非天然氨基酸取代。特定序列和制备方法将根据便利性、经济学、所需纯度等确定。

[0086] 所述多肽也可根据常规重组合成方法分离和纯化。可制备表达宿主的裂解液且可使用HPLC、排阻色谱法、凝胶电泳、亲和色谱法或其它纯化技术纯化裂解液。在大多数情况下,所用组合物相对于与产物制备方法和其纯化有关的污染物而言将包含至少20重量%的所需产物,更通常将包含至少约75重量%的所需产物、优选至少约95重量%的所需产物,并且为了治疗目的,通常将包含至少约99.5重量%的所需产物。通常,这些百分比将基于总蛋白。

[0087] 本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有编码序列和适当转录/翻译控制序列的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内重组/遗传重组。或者,能够编码相关多肽的RNA可化学合成。本领域技术人员可容易地利用熟知的密码子使用表和合成方法来提供任何本发明多肽的适合编码序列。直接化学合成方法包括例如磷酸三酯方法,Narang等,(1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99;磷酸二酯方法,Brown等,(1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151;二乙基亚磷酰胺方法,Beaucage等,(1981) *Tetra. Lett.*, 22:1859-1862;和固体支撑方法,美国专利第4,458,066号。化学合成产生单链寡核苷酸。它可通过与互补序列杂交,或通过使用单链作为模板与DNA聚合酶聚合而转化为双链DNA。虽然DNA化学合成通常限于约100个碱基的序列,但较长序列可通过较短序列的接合而获得。或者,可克隆子序列且可使用适当限制酶裂解适当子序列。

[0088] 核酸可以相当高的纯度分离和获得。通常,获得的核酸(DNA或RNA形式)将基本上不含其它天然存在的核酸序列,一般为至少约50%纯,通常为至少约90%纯且通常为“重组的”,例如侧接一个或多个在天然存在染色体上通常未缔合的核苷酸。本发明核酸可以线性分子形式或在环状分子内提供,且可在自主复制分子(载体)内或在不含复制序列的分子内提供。核酸的表达可自主调节或由本领域中已知的其它调节序列调节。可使用本领域中可用的多种技术,诸如转铁蛋白聚阳离子介导的DNA转移、用裸核酸或封装的核酸转染、脂质体介导的DNA转移、DNA涂布的乳胶珠粒的胞内转运、原生质体融合、病毒感染、电穿孔、基因枪、磷酸钙介导的转染等将本发明的核酸引入适合的宿主细胞中。

[0089] 在一些实施方案中,本发明提供用于一种或多种本发明的sAXL变体的体外或体内表达的表达载体,这些载体为组成性的或在一个或多个调节元件的控制下。在一些实施方案中,本发明提供包含一种或多种用于表达本发明的sAXL变体的表达载体(组成性或在—个或多个调节元件的控制下)的细胞群体。

[0090] 根据本发明的另一方面,其提供特异性结合于GAS6蛋白的分离的抗体或其片段。GAS6(生长停滞特异6)在结构上属于血浆维生素K依赖性蛋白家族。GAS6与天然抗凝剂蛋白S具有高结构同源性,共享相同模块组成且具有40%序列同一性。GAS6由于与TAM家族受体酪氨酸激酶(Tyro3、AXL和MerTK)相互作用而具有生长因子样性质。人GAS6是由介导结合于磷脂膜的富含 $\gamma$ -羧基谷氨酸(G1a)的域、四个表皮生长因子样域和两个层粘连蛋白G样(LG)域组成的678个氨基酸的蛋白。人GAS6的转录变体的序列可分别以NM\_001143946.1、NM\_001143945.1和NM\_000820.2在Genbank登录。

[0091] GAS6采用独特的作用机制,通过其维生素K依赖性GLA( $\gamma$ -羧基谷氨酸)模块与含有磷脂酰基丝氨酸的膜相互作用且通过其羧基末端LamG域与TAM膜受体相互作用。

[0092] 根据本发明,本发明的分离的抗体包括对GAS6具有可识别的结合特异性的任何分离的抗体。在一些实施方案中,分离的抗体是部分或完全人源化抗体。在一些其它实施方案中,分离的抗体是单克隆或多克隆抗体。在一些其它实施方案中,分离的抗体是嵌合抗体,例如具有来自不同来源的一致区、可变区和/或CDR3或其组合。在一些其它实施方案中,分离的抗体是本文所述各种特征的组合。

[0093] 根据本发明,本发明的分离的抗体的片段包括含有足以提供多肽对GAS6的可识别的特异性结合或所述结合所必需的抗体区域(在抗体支架或非抗体支架的情形下)的多肽。在一些实施方案中,本发明的分离的抗体的片段包括可变轻链、可变重链、重链或轻链的一个或多个CDR或其组合,例如Fab、Fv等。在一些实施方案中,本发明的分离的抗体的片段包括含有单链抗体(例如ScFv)的多肽。在另一些实施方案中,本发明的分离的抗体的片段包括单独可变区或可变区与Fc区的部分(例如CH1区)的组合。在另一些实施方案中,本发明的分离的抗体的片段包括微抗体(例如VL-VH-CH3)或双功能抗体。

[0094] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗体结合于与AXL相互作用的一个或多个氨基酸区域所包含或提供的表位。在一些其它实施方案中,本发明的分离的抗体结合于GAS6的一个或多个氨基酸区域(例如GAS6的L295-T317、E356-P372、R389-N396、D398-A406、E413-H429和W450-M468)所包含或提供的表位。

[0095] 在一些其它实施方案中,本发明的分离的抗体结合于一个或多个氨基酸区域,例如LRMFSGTPVIRLRFKRLQPT(SEQ ID NO:3)、EIVGRVTSSGP(SEQ ID NO:4)、RNLVIKVN(SEQ ID NO:5)、DAVMKIAVA(SEQ ID NO:6)、ERGLYHLNLTVGIPFH(SEQ ID NO:7)和WLNGETTTIQETVVNRM(SEQ ID NO:8)所包含或提供的表位。

[0096] 在一些其它实施方案中,本发明的分离的抗体结合于GAS6的L295-T317、E356-P372、R389-N396、D398-A406、E413-H429和W450-M468中的区域中的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸所包含或提供的表位。在一些其它实施方案中,本发明的分离的抗体结合于LRMFSGTPVIRLRFKRLQPT(SEQ ID NO:3)、EIVGRVTSSGP(SEQ ID NO:4)、RNLVIKVN(SEQ ID NO:5)、DAVMKIAVA(SEQ ID NO:6)、ERGLYHLNLTVGIPFH(SEQ ID NO:7)和WLNGETTTIQETVVNRM(SEQ ID NO:8)的区域中的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个氨



基酸所包含或提供的表位。

[0097] 在一些其它实施方案中,本发明的分离的抗体能够抑制、抑制或竞争野生型AXL或本发明的sAXL变体与GAS6之间的结合。

[0098] 根据本发明,本发明的sAXL变体和分离的抗体均可在适合治疗用途(例如人类治疗)的药物组合物中提供。在一些实施方案中,本发明的药物组合物包括一个或多个本发明的治疗实体,例如针对GAS6的sAXL变体和/或分离的抗体或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物或其任何前药。在一些其它实施方案中,本发明的药物组合物包括一个或多个本发明的治疗实体与另一细胞毒剂(例如另一抗肿瘤剂)的组合。在一些其它实施方案中,本发明的药物组合物包括一个或多个本发明的治疗实体与另一药学上可接受的赋形剂的组合。

[0099] 在一些其它实施方案中,本发明的治疗实体通常以包含活性治疗剂,即,和多种其它药学上可接受的组分的药物组合物形式施用。(参见Remington's Pharmaceutical Science,第15版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1980)。优选形式取决于预期的施用模式和治疗应用。根据所需制剂,所述组合物也可包括药学上可接受的无毒载体或稀释剂,这些载体或稀释剂是定义为通常用于配制供动物或人类施用的药物组合物的媒介物。所选稀释剂不应影响组合的生物活性。所述稀释剂的实例是蒸馏水、生理学磷酸盐缓冲液、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和汉克氏溶液(Hank's solution)。另外,所述药物组合物或制剂也可包括其它载体、佐剂或无毒、非治疗性、非免疫原性稳定剂等。

[0100] 在一些其它实施方案中,本发明的药物组合物也可包括大的缓慢代谢的大分子,诸如蛋白质、多糖(诸如壳聚糖)、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(诸如乳胶官能化Sepharose™、琼脂糖、纤维素等)、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体(诸如油滴或脂质体)。另外,这些载体可充当免疫刺激剂(即佐剂)。

[0101] 根据本发明的另一方面,其提供通过抑制AXL信号传导途径和/或GAS6信号传导途径来治疗、减轻或预防肿瘤转移或肿瘤侵袭的方法。在一些实施方案中,本发明方法包括抑制AXL活性、GAS6活性或AXL与GAS6之间的相互作用。例如,AXL或GAS6活性可在基因表达水平、mRNA加工水平、翻译水平、翻译后水平、蛋白激活水平等方面受到抑制。在一些其它实例中,AXL或GAS6活性可由小分子、生物分子(例如多肽)、多核苷酸、抗体、抗体药物缀合物等抑制。在一些其它实例中,AXL或GAS6活性可由一个或多个本发明的sAXL变体或分离的抗体抑制。

[0102] 在其它实施方案中,本发明方法包括对需要治疗的受试者施用治疗有效量或有效剂量的本发明的治疗实体,例如AXL活性或GAS6活性抑制剂或AXL与GAS6之间相互作用的抑制剂。在一些实施方案中,本文所述的例如用于治疗转移性癌症的本发明治疗实体的有效剂量视多种不同因素而变,这些因素包括施用方式、靶位点、患者的生理状态(无论患者为人或动物)、施用的其它药物,以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,患者是人,但也可治疗包括转基因哺乳动物的非人类哺乳动物。治疗剂量需要用滴定法测量以优化安全性和功效。

[0103] 在一些实施方案中,剂量可在约0.0001到100mg/kg宿主体重的范围内且更通常在0.01到5mg/kg宿主体重的范围内。例如,剂量可为1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。一示例性治疗方案需要每两周施用一次或一个月施用一次或每3到6个月施用

一次。本发明的治疗实体通常在多种时机施用。单一剂量之间的时间间隔可为每周、每月或每年。时间间隔也可为无规律的,如通过测量患者体内治疗实体的血液水平所指示。或者,本发明的治疗实体可以持续释放制剂形式施用,在所述情形下需要不太频繁的施用。剂量和频率视患者体内多肽的半衰期而变。

[0104] 在预防性应用中,在较长一段时间内以较低频率的时间间隔施用较低剂量。一些患者在其余生中继续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对较短的时间间隔施用相对较高剂量,直到疾病进展减慢或终止,且优选直到患者显示疾病症状的部分或完全改善。因此,可对患者施用预防性方案。

[0105] 在其它实施方案中,本发明方法包括治疗、减轻或预防卵巢癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、结肠癌、胆囊癌、胰腺癌、前列腺癌和/或胶质母细胞瘤的肿瘤转移或肿瘤侵袭。

[0106] 在一些其它实施方案中,对于预防性应用,对易患疾病或病况或以其它方式处于疾病或病况风险中的患者施用药物组合物或药物,其量足以消除或降低所述风险、减轻严重性或延迟疾病(包括疾病的生物化学、组织和/或行为症状、其并发症和在疾病发展期间呈现的中间病理表型)的开始。

[0107] 在一些其它实施方案中,对于治疗性应用,对疑似或已经患有这类疾病的患者施用本发明的治疗实体,其量足以治愈或至少部分停滞疾病的症状(生物化学、组织和/或行为,包括其并发症和在疾病发展中呈现的中间病理表型)。适于实现治疗或预防性治疗的量是定义为治疗或预防有效剂量。在预防性和治疗性方案中,药剂通常以若干种剂量施用直到已实现充分反应。通常,反应经过监测,并且如果存在癌症复发,则给予重复剂量。

[0108] 根据本发明,用于治疗转移性癌症的组合物可通过肠胃外、局部、静脉内、肿瘤内、口服、皮下、动脉内、颅内、腹膜内、鼻内或肌肉内方式施用。最典型的施用途径是静脉内或肿瘤内,不过其它途径可同样有效。

[0109] 对于肠胃外施用,本发明组合物可以物质于含有药物载体的生理学上可接受的稀释剂中的溶液或混悬液的可注射剂型施用,所述药物载体可为无菌液体,诸如水、油、盐水、甘油或乙醇。另外,例如湿润剂或乳化剂、表面活性剂、pH缓冲物质等辅助物质可存在于组合物中。药物组合物的其它组分是石油、动物、植物或合成起源的组分,例如花生油、大豆油和矿物油。一般说来,诸如丙二醇或聚乙二醇的二醇是优选的液体载体,尤其对于可注射溶液。抗体可以贮存注射液或植入制剂的形式施用,所述贮存注射液或植入制剂可以允许持续释放活性成分的方式进行配制。示例性组合物包含5mg/mL单克隆抗体,其在由50mM L-组氨酸、150mM NaCl组成的水性缓冲液(用HCl调节到pH 6.0)中配制。

[0110] 组合物通常制备为呈液体溶液或混悬液形式的可注射物;也可制备适合在注射前溶解于或悬浮于液体媒介物中的固体形式。所述制剂也可乳化或封装于脂质体或微粒子(诸如聚丙交酯、聚乙交酯或用于增强的佐剂效应的共聚物)中,如上文所论述。Langer, Science 249:1527,1990和Hanes,Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119,1997。本发明药剂可以贮存注射液或植入制剂的形式施用,所述贮存注射液或植入制剂可以允许持续或脉动释放活性成分的方式配制。

[0111] 适合其它施用模式的其它制剂包括口服、鼻内和肺用制剂、栓剂和透皮应用。

[0112] 对于栓剂,粘合剂和载体包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯;此类栓剂可由含有0.5%到10%范围内、优选1%-2%范围内的活性成分的混合物形成。口服制剂包括赋形剂,

诸如药品级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。这些组合物采用溶液、混悬液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或散剂的形式且含有10%-95%、优选25%-70%的活性成分。

[0113] 局部应用可引起透皮或皮内递送。可通过共施用药剂与霍乱毒素或其解毒衍生物或子单元来促进局部施用。Glenn等, *Nature* 391:851, 1998。共施用可通过以混合物形式或以通过化学交联或表达为融合蛋白而获得的连接分子的形式使用这些组分来实现。

[0114] 或者,透皮递送可使用皮肤贴片或使用传递体来实现。Paul等, *Eur. J. Immunol.* 25:3521-24, 1995; Cevc等, *Biochem. Biophys. Acta* 1368:201-15, 1998。

[0115] 药物组合物一般配制为无菌、基本上等渗的且完全遵从美国食品与药物管理局(U.S. Food and Drug Administration)的所有良好制造规范(Good Manufacturing Practice, GMP) 规章。

[0116] 优选地,本文所述的抗体组合物的治疗有效剂量将提供治疗益处,而不引起实质毒性。

[0117] 本文所述蛋白质的毒性可通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中,例如通过测定LD<sub>50</sub> (群体50%致死的剂量)或LD<sub>100</sub> (群体100%致死的剂量)来测定。毒性作用与治疗作用之间的剂量比是治疗指数。从这些细胞培养物测定和动物研究获得的数据可用于配制用于人类时无毒的剂量范围。本文所述蛋白质的剂量优选位于循环浓度范围内,这些浓度包括有效剂量而极少具有或不具有毒性。所述剂量可在这一范围内视所用剂型和所用施用途径而变。确切制剂、施用途径和剂量可由个别医师根据患者的病况加以选择。(参见例如Fingl等, 1975, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第1章)。

[0118] 包含本发明组合物(例如可溶性AXL变体和其制剂)和使用说明的试剂盒也在本发明的范围内。所述试剂盒可进一步含有至少一种额外试剂。试剂盒通常包括指示试剂盒内容物的预期用途的标签。术语标签包括提供于试剂盒上或与试剂盒一起提供的任何书面或记录材料,或其以其它方式随附于试剂盒。

[0119] 根据本发明的另一方面,其提供通过检测和/或测定来自相关受试者的生物样品中AXL活性或GAS6活性的水平来确定肿瘤发生肿瘤侵袭和/或转移的能力的方法。在一些实施方案中,AXL活性或GAS6活性的水平是由mRNA表达水平、蛋白质表达水平、蛋白质激活水平或对应于AXL或GAS6活性的任何适合指标直接或间接测量。在一些实施方案中,生物样品中AXL活性或GAS6活性的水平进一步与预定水平,例如通过基于来自未产生肿瘤侵袭或肿瘤转移的肿瘤或来自正常组织的样品群体建立AXL活性或GAS6活性的正常水平或范围所获得的标准水平相比较。例如,AXL活性或GAS6活性相较于预定水平或标准水平的增加指示肿瘤发生肿瘤侵袭或肿瘤转移的倾向。

[0120] 本说明书中所引用的所有出版物和专利均以引用的方式并入本文,就如同明确且单独地指出每个单独出版物或专利以引用的方式并入一般,且以引用的方式并入本文以公开和描述这些出版物所引用的相关方法和/或材料。对任何出版物的引用均是针对其在申请日前的揭示内容且不应解释为承认本发明无权先于根据先前发明的所述公布。此外,所提供的公布日期可不同于可需要独立确认的实际公布日期。

[0121] 本领域技术人员在阅读本发明时将显而易见的是,本文所描述和说明的各个实施方案具有分立的组分和特征,这些组分和特征可容易地与其它若干实施方案中任一者的特

征分离或与其组合,而不偏离本发明的范围和精神。任何所陈述的方法均可以所陈述事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行。在下文中,将描述实例以说明本发明的各部分。

[0122] 实验

[0123] 实例1

[0124] AXL信号传导的治疗性阻断会抑制转移性肿瘤进展

[0125] 但基本上还未研究证实AXL为转移性疾病的治疗靶,且更重要的是尚未证实AXL靶向的体内关联。我们证实AXL是人类乳癌和卵巢癌患者体内转移的标志物,且这些患者体内疾病的严重性与原发性肿瘤中AXL蛋白的量相关。最重要的是,我们证实肿瘤转移可在具有预先存在的转移的小鼠中通过施用可溶性AXL胞外域来治疗。在机理方面,抑制具有转移性疾病的动物体内的AXL信号传导会导致侵袭和MMP活性降低。我们的发现表明,通过施用可溶性AXL胞外域抑制肿瘤细胞中的AXL信号传导级联足以抑制转移性肿瘤进展。

[0126] 在这项研究中,测试AXL是否为针对人类癌症中的转移的关键因子和AXL信号传导的治疗性阻断是否可为转移性疾病的有效治疗。我们利用遗传和治疗方法来直接评估AXL在转移性乳癌和卵巢癌的起始和进展中的作用。

[0127] AXL是人类癌症中肿瘤进展和转移的标志物。我们首先比较正常组织、来自乳癌或卵巢癌患者的原发性肿瘤和转移中的AXL表达。在100%的正常相邻乳癌标本中,乳房上皮细胞显示针对AXL的扩散细胞质和细胞核染色,假定AXL是膜结合受体,所述染色被认为是背景染色(n=27,图1A)。然而,在原发性乳房肿瘤中,肿瘤上皮中的膜AXL染色在25%(1/4)的1级、76%(10/13)的2级和100%(18/18)的3级标本中存在(图1A和表1)。另外,AXL在88%(8/9)的淋巴结转移中表达。

[0128] 在浆液性卵巢癌标本中,首先在正常卵巢表面上皮(OSE)中检查AXL表达,因为大多数卵巢肿瘤被认为是源自这些细胞。在保持正常OSE的卵巢癌患者样品中,AXL在0%(0/5)的标本中表达(图1B)。相比之下,在原发性肿瘤上皮中的膜AXL染色存在于66%(6/9)的II期和83%(53/64)的III期患者样品中(图1B和I)。另外,来自诸如网膜和腹膜等常见转移性位点的肿瘤样品显示分别在75%(24/32)和90%(27/30)标本中的高AXL表达(图1B和表I)。这些发现表明原发性肿瘤中的AXL表达与晚期疾病和转移性肿瘤中所显示的转移相关。此外,这些数据显示源自人类乳癌和卵巢癌的转移表达高水平的AXL。

[0129] AXL是针对肿瘤转移的关键因子。为了检查AXL在转移中的功能作用,我们利用遗传方法来抑制乳房和卵巢转移的小鼠模型中的AXL。为此,我们筛检一组人类乳癌和卵巢癌细胞系进行AXL蛋白表达以便识别具有高AXL表达水平的转移性细胞系。类似于临床发现,AXL在大多数转移性乳房(NCI-ADR-RES、MDA-231、HS 578T、BT-549)和卵巢(SKOV3、OVCAR-8、ES-2、MESOV、HEYA8)细胞系中高度表达,而AXL在具有低转移潜力的细胞系(MCF7、MDA-MB435、T47D、IGROV1、OVCAR-3;图9)中以不可检测的量或低含量表达。AXL缺陷型转移性乳房(MDA-231)和卵巢(SKOV3ip.1和OVCAR-8)细胞系是使用先前所述的AXL shRNA靶向序列产生的。蛋白质印迹分析确认与表达scramble对照shRNA靶向序列(shSCRM,图9B)的细胞相比,表达shAXL靶向序列的细胞表达少于5%的AXL蛋白。

[0130] 为了直接评估AXL在乳房肿瘤转移的晚期的作用,注射AXL-野生型(shSCRM)和AXL-缺陷型(shAXL)MDA-231细胞到裸小鼠的尾静脉中并且在第28天评价肺中的肿瘤负荷。

肺的显微镜评价显示,5只注射shRNA scramble (shSCRM) MDA-231细胞的小鼠中的5只小鼠均产生转移性病灶,这些病灶针对AXL染色呈阳性(图2A)。相比之下,5只注射shRNA AXL (shAXL)的小鼠中没有一只小鼠在组织评价时产生肺转移(图2A)。为了量化这些小鼠的肺中的肿瘤负荷,我们针对人类GAPDH进行实时PCR分析。图2A表明,注射shSCRM MDA-231细胞的小鼠的肺表达高水平的人类GAPDH,表明存在源自MDA-231细胞的转移性病变。此外,注射shSCRM的小鼠在肺中表达人类AXL,表明存在AXL阳性肿瘤细胞(图2A)。相比之下,注射shAXL肿瘤细胞的小鼠不在肺中表达人类GAPDH或AXL。这些发现表明,AXL的遗传失活足以完全抑制这一模型中肺转移的形成。

[0131] 为了确定AXL的遗传失活是否影响卵巢癌细胞体内转移的能力,使用卵巢癌的腹膜异种移植模型来比较shSCRM和shAXL SKOV3ip.1细胞形成转移的能力。这一模型再现了人类卵巢转移的腹膜散布,其中小鼠在腹膜注射SKOV3ip.1细胞后快速产生进行性疾病,这一疾病由腹水和多于100个附着于肠系膜、隔膜、肝和其它腹膜表面的小的转移性病变组成(图3B)。SKOV3ip.1腹膜转移中AXL表达的免疫组织化学分析显示,类似于人类卵巢转移,AXL在SKOV3ip.1转移性病变中高度表达,表明这是用以研究AXL在卵巢转移中的作用(数据未显示)的相关模型系统。在腹膜注射shSCRM和shAXL细胞后28天,shSCRM小鼠呈现严重腹水和发病的征兆,使得我们有必要处死小鼠且研究注射shSCRM和shAXL的小鼠之间肿瘤负荷的改变。虽然注射shSCRM细胞的小鼠发展腹水和超过100个腹膜转移,但注射shAXL细胞的小鼠产生极少转移(图2B)。尺寸大于5mm的腹膜转移的平均数目从注射shSCRM的小鼠中的 $13.4 \pm 4.3$ 显著降到注射shAXL的小鼠中的 $0.8 \pm 0.5$ (图2B)。同样,这些肿瘤的平均重量从注射shSCRM的小鼠中的 $236 \pm 74$ mg显著降到注射shAXL的小鼠中的 $39.2 \pm 18$ mg(图2B)。给予这些发现以支持的是,OVCAR-8细胞中AXL表达的敲低显著抑制总的卵巢腹膜肿瘤质量和肿瘤数目(图2C)。总之,这些发现表明AXL是针对乳房和卵巢肿瘤转移的关键因子。

[0132] 考虑到AXL在体内形成转移中的重要作用,接下来我们设法确定AXL是否特异性调节转移,或AXL是否在肿瘤细胞增殖和生长的调节中起到一般作用。为了解决这些问题,我们进行体外增殖测定,其中在10-14天时间内在AXL野生型(shSCRM)与AXL缺陷型(shAXL)细胞之间对总细胞数计数。我们发现在shSCRM与shAXL MDA-231、SKOV3ip.1或OVCAR-8细胞之间细胞生长曲线无显著差异(图3)。同样,观察到在shSCRM与shAXL细胞之间常位MDA-231或皮下SKOV3ip.1肿瘤生长无显著差异(图3)。这些发现表明,AXL不为体内肿瘤细胞增殖或皮下生长所需。总之,我们的发现表明AXL特异性调节乳房和卵巢肿瘤中的肿瘤转移。

[0133] AXL调节肿瘤细胞侵袭。为了确定AXL介导的转移的潜在机制,我们采用无偏差的方法且直接比较AXL在与转移级联相关的关键细胞功能(包括增殖、侵袭、迁移、粘附和存活)中的作用。我们发现shAXL MDA-231、SKOV3ip.1和OVCAR-8细胞在通过I型胶原蛋白侵袭的能力方面严重受损(图4A)。我们还观察到shAXL细胞中细胞迁移的适度减少,但未能发现撤血清后粘附于ECM蛋白或存活方面的差异,表明AXL主要影响转移级联中的侵袭。

[0134] 在分子水平上,MMP-9近期已被鉴定为乳癌细胞中AXL介导的侵袭的效应物。因此,我们研究MMP-9表达或活性是否也在AXL缺陷型卵巢肿瘤细胞中改变。虽然SKOV3ip.1细胞不表达MMP-9,但我们发现MMP-2在这些细胞中高度表达且shAXL细胞中的MMP-2mRNA显著减少(图4B)。MMP-2荧光素酶报告基因测定显示,与shSCRM细胞相比shAXL细胞中的MMP-2启动子活性显著降低,表明AXL在转录水平下调节MMP-2(图4C)。明胶酶谱法测定显示,与

shSCRM SKOV3ip.1细胞相比shAXL细胞中分泌MMP-2的蛋白的水平显著降低(图4D)。总之,这些发现表明AXL在人类卵巢癌细胞中作为MMP-2表达和活性的上游调节子的作用。

[0135] 接下来我们设法说明AXL介导的MMP-2表达中所涉及的信号传导途径。已报道由GAS6激活AXL以直接诱导包括PI3K、RAS、MAPK、SRC和PLC在内的多种胞内信号传导途径。在这些途径中,已证实PI3K信号传导途径可调节卵巢癌细胞中的MMP-2表达和侵袭。为了确定PI3K信号传导是否受SKOV3ip.1细胞中AXL损失影响,我们针对AXL-野生型和AXL-缺陷型SKOV3ip.1细胞中Ser473处的磷酸化AKT (P-AKT) 进行蛋白质印迹分析。我们发现与shSCRM SKOV3ip.1细胞相比,显著抑制shAXL细胞中的P-AKT表达(图4E)。另外,饥饿SKOV3ip.1细胞的GAS6刺激引起PI3K依赖性诱导P-AKT,因为用PI3K抑制剂Ly294002治疗会完全消除GAS6诱导的P-AKT表达(图4E)。为了确定PI3K途径是否牵涉于AXL介导的MMP-2表达,我们在GAS6和Ly294002存在下进行MMP-2荧光素酶报告基因测定。GAS6刺激后MMP-2启动子活性的诱导完全由Ly294002治疗性阻断,表明GAS6/AXL信号传导通过PI3K信号传导事件调节MMP-2表达(图4F)。

[0136] AXL的治疗抑制显著抑制小鼠体内的转移性肿瘤进展。我们的发现迄今表明AXL是针对转移的关键因子,且支持以下假设,即治疗性阻断可为转移性疾病的有效治疗。为了检验这一假设,我们利用可溶性AXL胞外域作为抑制AXL信号传导的治疗策略。可溶性AXL胞外域在功能上充当诱饵受体且先前已显示体外和体内以纳摩尔级亲和力结合GAS6(图5A)。我们首先检查用可溶性AXL胞外域治疗是否足以抑制转移性肿瘤细胞中的AXL信号传导和侵袭。PI3K/AKT信号传导在多种细胞类型中由AXL调节。发现PI3K/AKT信号传导在SKOV3ip.1细胞中由GAS6/AXL信号传导调节且用可溶性AXL胞外域(sAXL)治疗能够减少GAS6治疗的SKOV3ip.1细胞中的PI3K/AKT激活(图5B和C)。同样,用sAXL治疗胶原蛋白中的MDA-231细胞足以急剧减少细胞侵袭,表明sAXL治疗影响体外AXL信号传导和侵袭(图5D)。

[0137] 接下来我们检查sAXL治疗是否将影响卵巢癌的高度转移性模型中的转移性肿瘤进展。我们首先在裸小鼠中确立SKOV3ip.1转移性病变(第1天)且在确认肉眼可见的病变后在第7天开始用sAXL治疗。sAXL疗法是使用腺病毒系统递送,在所述系统中,在注射后长达28天内肝释放全身产生的sAXL蛋白到小鼠血清中(图6A)。在第28天对肿瘤负荷进行肉眼观察分析,显示与用Fc对照疗法治疗的小鼠相比,接受sAXL疗法的小鼠的肿瘤负荷显著( $p < 0.01$ )减少。在SKOV3ip.1肿瘤模型中,与Fc治疗的小鼠相比,用sAXL治疗的小鼠中的总肿瘤重量和肿瘤数目减少63%(图6B)。同样,在OVCAR-8模型中,总肿瘤重量和肿瘤数目分别显著减少47%和42%(图11)。通过实时PCR分析检查SKOV3ip.1肿瘤中的MMP2表达水平且发现与用Fc对照治疗的小鼠相比,用sAXL治疗的小鼠的肿瘤中的MMP2水平显著降低(图6C)。这些结果表明,单一药剂AXL疗法足以显著减少产生疾病的小鼠中的转移性肿瘤负荷。此外,这些发现表明AXL对转移性肿瘤生长的治疗作用可涉及至少部分通过调节MMP活性来抑制侵袭。

[0138] 考虑到靶向MMP的先前抗转移抑制剂已显示出对正常组织毒性具有显著影响,我们在用sAXL疗法治疗21天的小鼠中对正常组织毒性进行全面分析。在用sAXL或Fc疗法治疗的裸小鼠中,我们未观察到行为、肉眼可见的或用显微镜可见的异常(图7)。

[0139] 侵袭和迁移是有助于肿瘤转移的发病机理的重要细胞固有性质。已推测靶向这些过程的治疗剂可为抑制转移的适用策略且可对患有转移性疾病的患者提供临床益处。在这

份报告中,显示受体酪氨酸激酶AXL是管理肿瘤细胞侵袭和转移的关键因子。最重要的是,显示使用可溶性AXL受体治疗性阻断AXL信号传导足以显著抑制患有预先存在的转移性疾病的小鼠体内的转移性肿瘤进展。在机理方面,我们的研究表明可溶性AXL疗法至少部分通过抑制MMP活性和侵袭而抑制肿瘤转移。最后,我们证实AXL在来自人类卵巢癌和乳癌患者的转移和晚期原发性肿瘤中高度表达,这凸显了我们的研究在临床上的重要性。

[0140] 本文中已证实AXL是针对人类癌症转移的关键因子且AXL信号传导的治疗性阻断是转移性疾病的有效治疗。此处,我们证实AXL在来自乳癌和卵巢癌患者的转移和晚期原发性肿瘤中高度表达。我们在遗传学方面证实,AXL对于使用裸小鼠模型使用疾病起始转移性乳癌和卵巢癌至关重要。最重要的是,我们已培养出高度特异性和无毒可溶性AXL受体作为抗AXL疗法且证实可溶性AXL受体疗法足以显著抑制患有预先存在的转移性疾病的小鼠体内的转移性肿瘤进展。我们的发现表明,抑制肿瘤细胞中的AXL信号传导级联可阻断转移性疾病的起始和进展。我们的数据暗示AXL为晚期和转移性乳癌和卵巢癌的治疗靶且提示抗AXL疗法可控制转移性疾病的起始和进展。

[0141] MMP在肿瘤细胞侵袭和转移的调节中起重要作用。然而,肿瘤细胞诱导MMP活性的机理仍不清楚。MMP表达在人类癌症中增加且与肿瘤进展和不良患者存活相关。人类癌症中很少见MMP中的基因扩增和激活突变,表明其它因子负责增强癌症中的MMP表达。我们的数据证明,MMP-2表达在人类卵巢癌细胞中由AXL在转录水平下调节。虽然AXL调节MMP-2表达的确切机理还未确定,但我们证实药理学抑制PI3K途径会在GAS6刺激的细胞中诱导MMP-2启动子活性,这表明对PI3K途径的作用(图8)。重要的是,我们的结果表明AXL的治疗性阻断可为抑制肿瘤中的MMP活性的有效且无毒策略。广谱MMP抑制剂在癌症试验中未成功,这部分是由于高水平的正常组织毒性。我们的发现表明,预计的抗AXL疗法的副作用很小。在小鼠中未观察到与可溶性AXL胞外域疗法的腺病毒介导的递送有关的任何正常组织毒性。此外,种系AXL和GAS6基因敲除小鼠可存活且为表型正常的成体,这表明AXL或GAS6不为发展或正常组织功能所需。

[0142] 我们证实单一药剂AXL疗法足以抑制转移性卵巢癌的高度转移性模型中的转移性肿瘤进展。这些发现对于治疗卵巢癌具有重要的临床意义。在美国,每年约有14,600人死于卵巢癌。目前,尚无FDA批准的生物制剂用于治疗卵巢癌,不过Avastin(靶向VEGF的mAb)和Tarceva(小分子EGFR激酶抑制剂)在临床试验中用于治疗晚期和复发性卵巢癌。卵巢癌的标准疗法包括疾病的最佳减灭手术,继而是细胞毒性铂-紫杉烷组合疗法。即使有这些努力,仍有80%的诊断患有卵巢癌的患者发展复发性疾病且这些患者中仅有30%在诊断后存活5年。

[0143] 我们的数据显示,AXL疗法是用于治疗晚期和复发性卵巢癌的有效佐剂疗法。研究中所用的转移性卵巢肿瘤进展模型类似手术减灭后人类患者体内复发性疾病的发展。我们发现AXL疗法能够减少产生疾病的小鼠体内的转移性肿瘤负荷达63%。在疾病进展期间产生的新的转移性病变显著减少。这一观察结果与我们的发现一致,显示AXL主要影响肿瘤细胞侵袭而非细胞增殖或生长。合起来,我们的结果表明AXL疗法主要用作抗转移剂且可最有效作为与当前细胞毒剂的组合疗法。

[0144] 总之,AXL是针对转移的关键因子且AXL信号传导的阻断在转移中具有治疗益处。这些研究为转移性疾病的抗AXL疗法提供了重要的临床前数据。

[0145] 方法

[0146] 细胞系。卵巢SKOV3、SKOV3ip.1和HEYA8细胞是以赠品获自Dr.Gordon Mills (MD Anderson Cancer Center)。卵巢ES-2和MESOV细胞是来自Dr.Branimir Sikic (Stanford University) 的赠品。MDA-231、OVCAR-3和MCF-7细胞是购自ATCC。IGROV-1和OVCAR-8细胞是购自NCI-Frederick DCTD肿瘤细胞系库。在37℃下,在5%CO<sub>2</sub>孵育器中,将细胞在补充有10%热灭活胎牛血清和1%青霉素和链霉素的适当培养基中培养。来自乳癌和卵巢癌细胞系的NCI60小组的细胞团由Dr.Giovani Melillo (NCI-Frederick) 提供。

[0147] 患者和组织微阵列。人类乳房组织微阵列购自US Biomax (BR1002)。卵巢人类组织微阵列是获自斯坦福大学病理学系 (Stanford University Pathology Department)。总共73个石蜡包埋的肿瘤样品是获自1995-2001年间斯坦福医院 (Stanford Hospital) 先前未治疗的卵巢癌患者。这些原发性卵巢肿瘤样品组装到由每个患者两个样品组成的组织微阵列中。来自腹膜的另外30个肿瘤样品也在此微阵列中进行评价。所有患者均具有浆液性卵巢癌,且根据国际妇产科学联盟 (International Federation of Gynecology and Obstetrics) 标准获得分期信息。所有标本和其相应的临床信息均根据由斯坦福大学伦理审查委员会批准的协议收集。其它可购得的肿瘤微阵列用于检查来自网膜的32个转移性病变 (US Biomax)。

[0148] AXL免疫组织化学。在标准免疫组织化学方法后,将石蜡包埋的组织载玻片用二甲苯去除石蜡,再水合且暴露。AXL一级抗体 (RandD Systems) 以1:500稀释度使用。所有样品的阴性对照均使用二级抗体单独进行。抗原-抗体复合物是使用VECTASTAIN ABC系统 (Vector Laboratories) 和针对过氧化物酶的DAB底物试剂盒 (Vector Laboratories) 根据制造商协议来目测。载玻片用苏木精复染。根据对AXL表达呈阳性的细胞的百分比在显微镜下对肿瘤细胞膜上的AXL染色评分 (0是不存在,1是针对不良品质样品,2是针对5-60%且3是针对61-100%)。

[0149] 报告基因测定。由1659bp MMP-2启动子驱动的MMP-2报告基因质粒是赠品。shSCRM和shAXL SKOV3ip.1细胞中的荧光素酶活性是通过Dual-Glo荧光素酶测定试剂 (Promega) 测定且在Monolight 2010照度计 (Analytical Luminescence Laboratory) 中测量。将萤火虫荧光素酶活性归一化为Renilla活性。一式三份进行测定且重复两次。

[0150] 瞬时和逆转录病毒转染。瞬时DNA转染用Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 根据制造商说明进行。将0.1μg MMP-2cDNA (OpenBiosystems) 转染到6孔皿中。

[0151] siRNA: 靶向AXL或对照的siRNA序列购自Dharmacon。所有siRNA转染均使用Dharmacon Smart Pools与Dharmafect 1转染试剂根据制造商的方案 (Dharmacon, Lafayette, CO) 进行。

[0152] shRNA: 用于AXL RNA的特定降解的寡核苷酸合成为先前所述的5' - GATTTGGAGAACACACTGA - 3'。将Scramble序列用作非靶向shRNA 5' - AATTGTACTACACAAAAGTAC - 3'。将这些寡核苷酸克隆到RNAi-Ready pSiren RetroQ (BD Bioscience) 载体中且SKOV3ip.1、MDA-231和OVCAR-8细胞通过这些载体进行逆转录病毒转导。在嘌呤霉素 (Sigma) 中选择受感染细胞且通过蛋白质印迹分析测试多克隆群体的降低的AXL表达水平。

[0153] 质粒。对应于氨基酸1-451的AXL胞外域从人类AXL cDNA (Open Biosystems) 扩增



且克隆到CMV驱动的pADD2腺病毒穿梭载体中。在HCT116细胞中,使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 根据制造商用对照载体或AXL 1-451进行瞬时DNA转染。转染后48-72小时收集条件培养基。

[0154] 粘附测定。SKOV3ip.1shSCRM和shAXL细胞用5 $\mu$ m CMFDA (Molecular Probes) 荧光标记。使用非酶促细胞解离缓冲液 (Gibco) 洗涤和分离细胞。将细胞 ( $5 \times 10^5$ ) 接种到96孔板中且用50 $\mu$ g/ $\mu$ l胶原蛋白I型 (BD Bioscience) 预涂布。在37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟后,小心洗涤细胞5次。使用荧光分光光度计测量荧光活性(激发,494nm;发射,517nm)。

[0155] SKOV3ip.1粘附于胶原蛋白I型。将SKOV3ip.1shSCRM和shAXL细胞用5 $\mu$ m CMFDA (Molecular Probes) 荧光标记。使用非酶促细胞解离缓冲液 (Gibco) 洗涤和分离细胞。将细胞 ( $5 \times 10^5$ ) 一式三份接种到96孔板中且用50 $\mu$ g/ $\mu$ l胶原蛋白I型 (BD Bioscience) 预涂布。在37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟后,小心洗涤细胞5次。使用荧光分光光度计测量荧光活性(激发,494nm;发射,517nm)。

[0156] MDA-231粘附于ECM蛋白。MDA-231shSCRM和shAXL ( $0.5 \times 10^6$ ) 细胞一式三份接种到含有包括层粘连蛋白、胶原蛋白I和IV、纤连蛋白和纤维蛋白原的ECM蛋白阵列的孔中。将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时且在PBS中洗涤。根据制造商的方案 (CellBioLabs) 在OD 560下染色和量化粘附细胞。

[0157] 迁移测定。如先前所述体外检查细胞迁移。简言之,对细胞进行24小时血清剥夺且一式三份接种 ( $2.5 \times 10^4$ 个细胞) 到未涂布的插入物 (BD Biosciences) 上,移到含有FBS作为化学引诱物的室中且孵育24小时。去除非侵袭细胞后,固定膜底部的细胞,染色且计数。对每个膜的5个区域进行计数。迁移%如下确定:(在shAXL细胞中迁移的细胞的平均数目/在shSCRM细胞中迁移的细胞的平均数目)  $\times 100$ 。一式三份进行实验且重复3次。

[0158] 胶原蛋白侵袭测定。如先前所述进行胶原蛋白侵袭测定。简言之,将533个细胞接种到48孔板上的胶原蛋白I型中。将细胞在标准培养基或添加有条件对照培养基或sAXL-条件培养基的培养基中培养5-7天且拍摄照片。通过胶原蛋白侵袭是通过计算每20X区域呈现分枝表型的肿瘤细胞的百分比来量化。对每个样品3个区域计数。一式三份进行实验且重复2次。

[0159] 明胶底物酶谱法。使SKOV3ip.1shSCRM和shAXL细胞血清饥饿48小时。将25,000个细胞接种到96孔板中且24小时后收集条件培养基。将等体积的条件培养基在非还原性条件下在10%酶谱凝胶 (Invitrogen) 上跑胶。电泳后,在2.5% (v/v) Triton X-100中洗涤凝胶以去除SDS且在50mM Tris-HCl、5mM CaCl<sub>2</sub>和0.1% Triton X-100 (pH 7.8) 洗涤,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。用溶解于40%甲醇和10%冰乙酸中的0.25% (w/v) 库马斯亮蓝 (Coomassie Brilliant Blue) R250将酶谱染色30分钟。在40%甲醇和10%冰乙酸中使凝胶变色。一式两份进行实验且重复3次。

[0160] 细胞增殖测定。对于单层生长曲线,将细胞 (50,000个) 一式三份接种到60mm皿中。每3天,使细胞胰蛋白酶化,使用细胞计数器 (库尔特计数器 (coulter counter)) 计数,且再接种50,000个细胞并计数。

[0161] XTT存活测定。细胞活力通过先前所述的XTT测定来测量。简言之,用含有0.3mg/mL XTT和2.65 $\mu$ g/mL N-甲基二苯并吡嗪甲基硫酸盐的无酚红培养基孵育用血清滋养或血清饥饿的细胞 (0、3、6和7天)。使96孔板返回37 $^{\circ}$ C孵育器中并保持1到2小时。通过测量450nm下的

吸光度量化XTT的代谢。

[0162] 蛋白分离和蛋白质印迹分析。在9M尿素、0.075M Tris缓冲液(pH 7.6)中收集蛋白裂解液。蛋白裂解液使用Bradford测定来量化且使用标准方法进行还原性SDS-PAGE。用针对AXL的抗体(RandD系统)、 $\alpha$ 微管蛋白(Fitzgerald抗体)、AKT(细胞信号传导)、磷酸化AKT(细胞信号传导)探测蛋白质印迹。

[0163] 对于GAS6刺激,使细胞血清饥饿24小时。接着用25 $\mu$ m PI3K抑制剂(Ly294002, Bio Mol Research Laboratory)或含有AXL胞外域的1001条件培养基处理细胞4小时,随后用400ng/ml GAS6处理15分钟。

[0164] 为分析小鼠血清中的sAXL表达,通过凝胶电泳分析来自每个样品的1.5 $\mu$ l血清。

[0165] 腺病毒的产生和制备。使对应于氨基酸1-451的AXL胞外域从AXL cDNA(Open Biosystems)扩增且通过同源重组克隆到E1<sup>-</sup>E3<sup>-</sup>Ad菌株5的E1区域中,随后在293细胞中制备腺病毒且进行CsCl梯度纯化,如先前所述。如先前所述进行sAXL腺病毒的制备和纯化。表达鼠类IgG2-Fc免疫球蛋白片段的阴性对照的产生和制备先前已有描述。

[0166] 作为腹膜异种移植物的SKOV3ip.1和OVCAR-8细胞的生长。所有涉及动物和其管理的程序均由斯坦福大学的机构动物管理与使用委员会(Institutional Animal Care and Usage Committee)根据机构和NIH准则批准。

[0167] 将对照和AXL SKOV3ip.1和OVCAR-8细胞分别以0.5ml PBS中的 $1 \times 10^6$ 和 $5 \times 10^6$ 个细胞腹膜内注射到雌性裸小鼠中。处死后,量化腹水,对转移性病变计数,将所有可见的病变更切开并清除以称取肿瘤重量。

[0168] 将SKOV3ip.1和OVCAR-8亲本细胞分别以0.5ml PBS中的 $1 \times 10^6$ 和 $5 \times 10^6$ 个细胞腹膜内注射到雌性裸小鼠中。肿瘤细胞注射后7(SKOV3ip.1)或14(OVCAR-8)天,将0.1ml PBS中的sAXL或对照( $1.9 \times 10^8$ 个腺病毒pfu)注射到小鼠的尾静脉中。处死后,量化腹水,对转移性病变计数,将所有可见的病变更切开并清除以称取总肿瘤重量。

[0169] 组织毒性研究。将SKOV3ip.1亲本细胞分别以0.5ml PBS中的 $1 \times 10^6$ 和 $5 \times 10^6$ 个细胞腹膜内注射到雌性裸小鼠中。肿瘤细胞注射后7天,将0.1ml PBS中的sAXL或对照( $1.9 \times 10^8$ 个腺病毒pfu)注射到小鼠的尾静脉中。第28天,处死小鼠。收集血液且由斯坦福大学的比较医学系(Department of Comparative Medicine)进行综合代谢小组和CBC分析。从包括肝、肾、脑和脾在内的所有主要器官收集组织样品,固定于10%福马林中,包埋于石蜡中,切片且用苏木精和曙红复染。

[0170] 体内尾静脉转移测定。将对照和AXL shRNA MDA-231细胞以0.1ml PBS中的 $5 \times 10^5$ 个细胞静脉内注射到裸小鼠的尾静脉中。注射后4周,处死小鼠。对用苏木精和曙红染色的福马林固定、石蜡包埋的肺的代表性切片进行肺病灶的显微镜评价。由委员会认证的药理学者确认对具有最少四个具有最大细胞核且对AXL表达呈阳性的人类细胞的肺病灶的正确鉴定。小鼠肺中的肿瘤负荷通过从全肺分离的RNA中人类GAPDH和AXL表达的实时PCR分析来量化。

[0171] 作为常位肿瘤的MDA-231细胞的生长。MDA-231细胞在6周大的雌性裸(nu/nu)小鼠中在将0.1ml PBS中的 $10^7$ 个细胞皮内注射到乳房脂肪垫中后作为皮下常位肿瘤生长。在38天疗程内用测径器测量肿瘤。使用下式计算体积:宽度<sup>2</sup>×长度×0.5。

[0172] 作为皮下肿瘤的SKOV3ip.1细胞的生长。将0.1ml PBS中的5,000,000个细胞皮下

植入到6周大的雌性裸 (nu/nu) 小鼠的肋腹中。在45天时程内用测径器测量肿瘤。使用下式计算体积:宽度<sup>2</sup>×长度×0.5。

[0173] RNA和实时PCR分析。RNA是使用trizol根据制造商的方案 (Invitrogen) 从细胞和组织分离。cDNA是使用针对逆转录-PCR的SuperScript第一链合成系统 (Invitrogen) 从2μg DNase (Invitrogen) 处理的RNA合成而来。使用SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) 对1μl cDNA进行PCR扩增。以下引物对用于扩增特异靶基因:18S FWD:5-GCCCGAAGCGTTTACTTTGA-3 REV:5-TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC-3;AXL FWD:5-GTGGGCAACCCAGGGAATATC-3 REV:5-GTACTGTCCCGTGTCGGAAAG;GAPDH 5-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3 REV:5-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3;MMP-2 FWD:5-GCCCCAGACAGGTGATCTTG-3 REV 5-GCTTGCAGGGAAGAAGTTGT-3。在Prism 7900序列检测系统 (Applied Biosystems) 上进行PCR扩增。所用热循环分布是在50℃下变性2分钟且在95℃下变性10分钟,随后是在95℃下变性15秒且在60℃下变性1分钟的循环。使用18S归一化mRNA。相对mRNA表达水平是使用相对标准曲线方法根据制造商的说明 (Applied Biosystems) 来确定。

[0174] 统计学分析。使用费希尔精确测试 (Fisher's exact test) 来测试AXL表达与肿瘤形成和转移之间的关联。所有其它统计学测试均使用斯氏t检验进行。p值<0.05的值被认为具有统计学显著性。

[0175] 缩写:GAS6,生长停滞特异基因6;MMP-2,基质金属蛋白酶;EOC,上皮卵巢癌;ECM,胞外基质;AKT,v-akt鼠类胸腺瘤病毒致癌基因同系物。

[0176] 表1.AXL染色与肿瘤参数的统计学分析

[0177]

| 评分                      | 0      | 1      | 2       | 3       | 总计 |
|-------------------------|--------|--------|---------|---------|----|
| <b>乳房</b>               |        |        |         |         |    |
| <b>浸润性导管癌</b>           |        |        |         |         |    |
| 1级                      | 3 (75) | 0 (0)  | 0 (0)   | 1 (25)  | 4  |
| 2级                      | 3 (23) | 0 (0)  | 5 (38)  | 5 (38)  | 13 |
| 3级                      | 0 (0)  | 0 (0)  | 7 (39)  | 11 (61) | 18 |
| 总计                      | 6      | 0      | 12      | 17      | 35 |
| <b>Pearson X2 P 值 =</b> |        |        |         |         |    |
| <b>转移性浸润性导管癌</b>        | 0 (0)  | 1 (11) | 4 (44)  | 4 (44)  | 9  |
| <b>淋巴结</b>              |        |        |         |         |    |
| <b>卵巢</b>               |        |        |         |         |    |
| <b>浆液性腺癌</b>            |        |        |         |         |    |
| II期                     | 3 (33) | 0 (0)  | 3 (33)  | 3 (33)  | 9  |
| III/IV期                 | 6 (9)  | 5 (8)  | 14 (22) | 39 (61) | 64 |
| 总计                      | 9      | 5      | 17      | 42      | 73 |
| <b>Pearson X2 P 值 =</b> |        |        |         |         |    |
| <b>转移性浆液性腺癌</b>         |        |        |         |         |    |
| 网膜                      | 3 (9)  | 5 (16) | 6 (19)  | 18(56)  | 32 |
| 腹膜                      | 1 (3)  | 2 (7)  | 12(40)  | 15(50)  | 30 |
| 总计                      | 4      | 7      | 18      | 33      | 62 |

[0178] 各值表示为n(%)。对于肿瘤细胞,膜染色评分为0,不存在;1,不能评分;2,5到

60%阳性;3,61到100%阳性。

[0179] 实例2

[0180] 我们证实与未治疗的对照相比,通过使用腺病毒表达系统在小鼠中过度表达野生型可溶性AXL来抑制GAS6配体结合于细胞AXL可使得肿瘤负荷减少,如通过肿瘤数目和尺寸所测量,这进一步凸显了在临床前小鼠模型中GAS6和AXL作为抑制转移进展的关键靶和有效策略的重要性。

[0181] 本文提供工程改造过的AXL胞外域的可溶性变体,其对配体GAS6具有高亲和力,从而使其整合所述配体并减弱内源性AXL信号传导。工程改造过的变体与野生型AXL相比具有大大提高的对Gas6的亲和力。

[0182] AXL的胞外域包含两个IgG样域和两个纤连蛋白样域。主要的GAS6结合位点在Ig1域中且次要的GAS6结合位点在Ig2域中。

[0183] 为进一步增强主要结合位点的亲和力,我们对与AXL SwissProt条目P30530对应的具有断点19-132的Ig1域进行工程改造。突变体库是通过使用标准分子生物学技术对AXL受体的Ig1域进行易错PCR而产生的。该库使用酵母表面呈现来表达且通过荧光激活的细胞分选(FACS)进行筛检以分离对可溶性GAS6展现出增强的结合亲和力的突变体。在我们的库筛检方法中,突变体蛋白库经过多轮分选,其中连续各轮可减小库的大小,同时强化所需突变体蛋白质性质,其在这种情形下对GAS6的结合亲和力较高。

[0184] 为了获得对GAS6具有显著较强亲和力的AXL突变体,在后来的各轮分选中使用“解离速率”分选。对于解离速率分选,首先将蛋白突变体库与可溶性GAS6一起孵育,接着用缓冲液洗涤以从溶液中去掉未结合的GAS6。接下来,突变体库在室温下在过量可溶性竞争者存在下孵育2、4、6、12或24小时。过量竞争者用于整合从酵母呈现的AXL解离的GAS6,使无结合步骤不可逆。使用FACS收集保持结合于GAS6的突变型AXL蛋白。0、4和6小时的解离速率步骤后通过汇集的第5轮分选产物分析与GAS6的结合,显示这些产物与野生型AXL相比在持久结合于GAS6方面展现显著改进(参见图12)。条线图量化了来自点图的数据,表明库成员的显著改进。这些产物的定序识别了Ax1 Ig1域内关于汇集的第5轮分选产物所观察到的赋予增强的针对Gas6的亲和力的若干突变(图12和表2)。第6轮分选进一步强化来自第5轮分选产物的3种特定克隆物。表2显示AXL序列内的独特氨基酸突变,这些突变含于第5轮和第6轮分选产物中。在这个表格中,顶行中的残基数目指示野生型AXL中的氨基酸残基。第二行指示在野生型AXL中的既定位置可见的残基。在随后各行中,指定既定突变体中存在的氨基酸突变。突变体内不存在针对特定残基的氨基酸(例如表2中的空白区或空白单元)表示这个氨基酸残基不是从野生型残基突变而来。氨基酸残基的标准单字母名称的使用是本领域技术人员充分了解的。

[0185] 显示来自分选5和6产物的独特序列,以及与野生型AXL相比汇集的克隆物的结合性质,表明汇集的第5轮分选产物在GAS6结合方面存在实质性改进。

[0186] 使用这种定向进化方法分离的突变体包括表3中所示的氨基酸取代。

[0187] 表3. 使用定向进化分离的突变体

[0188]

|        |    |    |    |    |    |    |    |     |
|--------|----|----|----|----|----|----|----|-----|
|        | 26 | 32 | 33 | 74 | 79 | 87 | 92 | 127 |
| Wt-AXL | E  | G  | N  | S  | V  | D  | V  | G   |

|          |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ax1 S6-1 |   | S |   |   |   | G | A | R |
| Ax1 S6-2 | G |   |   |   | M |   | A | E |
| Ax1 S6-5 |   |   | S | N |   | G | A |   |

[0189] 根据由Sasaki等(EMBO J 2006)所报道的GAS6-AXL复合物的晶体结构,上文所示的所有突变(除E26G、G32S、N33S和G127R/E外)均位于AXL与GAS6之间的结合界面处。

[0190] 选择来自第6轮分选的个别突变体AXL S6-1和AXL S6-2进行进一步研究。进行野生型AXL、AXL S6-1和AXL S6-2的平衡结合滴定以比较野生型或突变型AXL蛋白与GAS6的相互作用的亲和力。将数据拟合为四点S形曲线且取中点作为平衡结合常数 $K_D$ 。突变体AXL S6-1和AXL S6-2展现与野生型AXL相比在GAS6结合亲和力方面存在实质性改进(图13和表4)。野生型AXL对Gas6的结合亲和力( $K_D$ )为 $2.4 \pm 1.2 \times 10^{-9} M$ ; AXL S6-2对Gas6的结合亲和力( $K_D$ )为 $1.89 \pm 0.37 \times 10^{-10} M$ ; 且AXL S6-1对Gas6的结合亲和力( $K_D$ )为 $1.12 \pm 0.23 \times 10^{-10} M$ 。对于AXL S6-1和AXL S6-2,这个GAS6结合亲和力分别是野生型AXL的22倍和12.8倍(表4)。

[0191] 表4. 野生型和突变型AXL蛋白对Gas6的结合亲和力( $K_D$ )。

| 平衡 Gas6 结合    |                        |                        |        |
|---------------|------------------------|------------------------|--------|
|               | $K_D$ (M)              | +/- (M)                | wt 的倍数 |
| [0192] wt AXL | $2.4 \times 10^{-9}$   | $1.2 \times 10^{-9}$   | ---    |
| S6-1          | $1.12 \times 10^{-10}$ | $0.23 \times 10^{-10}$ | 22     |
| S6-2          | $1.89 \times 10^{-10}$ | $0.37 \times 10^{-10}$ | 12.8   |

[0193] 我们还使用可变温度圆二色性扫描来研究野生型和突变型AXL蛋白的热稳定性。这项技术监测折叠蛋白的二次结构元件随温度展开的情形。监测每种蛋白随温度变化的椭圆度且将数据拟合为标准两态展开曲线。熔融温度( $T_m$ )是展开曲线的中点。野生型AXL展现 $41.3 \pm 0.6^\circ C$ 的熔融温度; AXL S6-1展现 $54.0 \pm 0.9^\circ C$ 的熔融温度(热稳定性比野生型AXL高大约 $13^\circ C$ ); Ax1 S6-2展现 $41.55 \pm 0.02^\circ C$ 的熔融温度(热稳定性与野生型AXL大致类似)(表5)。

[0194] 表5. 如通过可变温度圆二色性扫描所测定的野生型和突变型AXL蛋白的热稳定性。

|               | 平均 $T_m$ ( $^\circ C$ ) | +/- ( $^\circ C$ ) | wt 增加 ( $^\circ C$ ) |
|---------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| [0195] wt AXL | 41.27                   | 0.63               | ....                 |
| S6-1          | 54.01                   | 0.86               | 12.73                |
| S6-2          | 41.55                   | 0.02               | 0.28                 |

[0196]

表 2

来自分选 5 和 6 的 AXL Ig1 突变体(总计 141 个定序的随机克隆, 25 个独特变体)

| 克隆        | bp | AA | 19 | 23 | 26 | 27 | 32 | 33 | 38 | 44 | 51 | 63 | 72 | 74 | 78 | 79 | 86 | 87 | 88 | 90 | 92 | 97 | 98 | 105 | 109 | 112 | 113 | 118 | 118 | 127 | 129 | 重复次数 |     |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| wtAXL     |    | A  | T  | E  | E  | G  | N  | T  | T  | H  | D  | A  | S  | Q  | V  | Q  | Q  | Q  | D  | I  | V  | I  | T  | T   | Q   | V   | F   | H   | T   | G   | E   |      |     |
| AXL 56-1  | 8  |    |    |    | S  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | G  |    |    | A  |    |    |    |     |     |     |     |     |     | R   |     | 62   |     |
| AXL 56-2  | 5  |    |    | G  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | M  |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     | E   |     | 21   |     |
| AXL 56-5  | 5  |    |    |    | S  |    |    |    |    |    |    | N  |    |    |    |    | G  |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 56-4  | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | V  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | R  |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-2  | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 16   |     |
| AXL 56-4  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | V  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-5  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 7    |     |
| AXL 55-9  | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | R  |    |    | V  | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 10   |     |
| AXL 55-13 | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | V  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | D  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-22 | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    | N  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-24 | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 2    |     |
| AXL 55-29 | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Y  | V  |    |    |    |    |    |    |    | N  | A  |    | A  |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-20 | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    | R   |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-38 | 10 |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    | V  |    |    |    |    |    |    |    | V  |    |    | M  |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-40 | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | G  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 2    |     |
| AXL 55-45 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-31 | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-53 | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    | F  |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-53 | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 2    |     |
| AXL 55-68 | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 3    |     |
| AXL 55-68 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-74 | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | V  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-76 | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-77 | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
| AXL 55-78 | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | M  | A  |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 1    |     |
|           |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |      | 141 |

\* bp = DNA 片段的大小, AA = 氨基酸突变的位置, 注意一些 DNA 突变为沉默的, 特定克隆出现的总次数在最右一列中给出。

[0197]

实例 3

[0198] 可溶性Ax1变体体外抑制转移性肿瘤进展

[0199] GAS6-AXL信号传导已牵涉包括乳癌、肺癌以及结肠癌和(近期通过此处提供的工作)卵巢癌在内的实体肿瘤的多种侵袭性形式的进展中。虽然已在AXL表达与疾病阶段和患者预后之间观察到不同关联,但很多情况下未证实AXL为用于治疗转移的治疗靶。在实例1中,我们证实AXL确实是人类乳癌和卵巢癌患者体内转移的标志物,原发性肿瘤上的AXL表达水平与所述疾病的严重性相关。这些结果表明,拮抗GAS6-AXL信号传导途径可提供用于治疗转移性疾病的治疗窗。如实例1中所概述,为了验证AXL为治疗靶的潜力,在人类卵巢癌的侵袭性小鼠模型中使用腺病毒递送来施用可溶形式的AXL野生型胞外域。我们证实与对照相比,肿瘤转移在接受可溶性AXL治疗的小鼠中显著减少。这些数据表明,使用可溶性AXL拮抗肿瘤细胞中的GAS6-AXL信号传导可抑制所述疾病的转移性进展。基于这些结果,我们证实工程改造过的对GAS6的亲合力较高的AXL突变体作为抗转移剂引起较大功效,且治疗上更相关的递送可溶性AXL的模式仍产生显著结果。

[0200] 在这项研究中,我们使用实验1中所概述的相同人类卵巢癌模型且对具有预先存在的转移性疾病的小鼠腹膜内施用纯化过的可溶性AXL (sAXL) 变体。我们测试野生型AXL和AXL S6-1(工程改造过的高亲合力突变体)且均与一种AXL形式E59R/T77R比较,在E59R/T77R中消除GAS6结合。我们的结果突出显示,增强的AXL S6-1亲合力引起较大的治疗功效,因为通过所有转移性病变的数目和总重量所评估的肿瘤负荷减少相比野生型AXL和AXL E59R/T77R阴性对照均显著降低。这些发现进一步验证AXL和GAS6为用于抑制转移的治疗靶且支持工程改造过的高亲合力AXL突变体S6-1为GAS6-AXL信号传导系统的有效拮抗剂。

[0201] 虽然实例1显示sAXL的腺病毒递送会产生治疗功效,但这种递送方法临床上不相关且因此证实纯化过的sAXL的递送将产生类似结果。野生型AXL、AXL S6-1和AXL E59R/T77R融合于小鼠IgG2a的片段可结晶区(Fc)以便改进药物动力学。这三种AXL融合(AXL-Fc)变体之间的唯一差别是见于AXL Ig1域中的突变,这些突变概述于表6A中。编码AXL-Fc蛋白的DNA是使用EcoRI和SalI限制位点克隆到CMV驱动的pADD2腺病毒穿梭载体中。编码这三种AXL突变体的pADD2质粒是使用来自Life Technologies的Freestyle表达试剂盒,如制造商所述独立转染到HEK 293细胞中。使用蛋白A亲和色谱法,随后使用尺寸排阻色谱法从培养物上清液纯化蛋白质。

[0202] 表6.

[0203]

| 蛋白质名称            | 说明  |
|------------------|---|
| 野生型 AXL-Fc       | 融合于小鼠 IgG2a 的 Fc 区的野生型 AXL 胞外域, 氨基酸 19-440.                                     |
| AXL S6-1-Fc      | 如上文对于野生型 AXL-Fc 所述的 AXL-Fc 融合, 但 AXL Ig1 域含有以下关于 S6-1 的突变: G32S、D87G、V92A、G127R |
| AXL E59R/T77R-Fc | 如上文对于野生型 AXL-Fc 所述的 AXL-Fc 融合, 但 Axl Ig1 域含有 E59R 和 T77R 突变, 这些突变显著减弱对 Gas6 的结合 |

[0204] 为评估AXL-Fc突变体抑制体内转移的能力,使用如实例1中所概述的相同的人类卵巢癌的腹膜异种移植模型。此模型再现了人类卵巢癌转移的腹膜散布,因为SKOV3ip.1细胞施用后4周,小鼠快速发展由腹水和许多(>100个)小的转移性病变组成的高度侵袭性疾病。此模型是人类卵巢癌的极准确的表示,因为大多数患者在诊断时患有明显转移性疾病。小鼠注射SKOV3ip.1细胞且使肿瘤接种7天。在第7天,我们将小鼠随机分成3个研究组且开始野生型AXL-Fc、S6-1-Fc或E59R/T77R-Fc的施用性治疗。一周两次将溶解于磷酸盐缓冲盐水中的纯化过的蛋白质以10mg/kg的剂量施用于小鼠,历时3周,总计6剂。在第28天,将所有小鼠处死且进行尸检以评估总体肿瘤负荷,如通过可见的转移性病变的数目以及所有病变的总重量所测量。治疗组之间存在显著差别且代表性图像显示于图14中。接受E59R/T77R-Fc阴性对照治疗的小鼠具有平均 $86.3 \pm 21.9$ 个腹膜转移。对于接受野生型AXL-Fc的小鼠,这一数字降到 $48.1 \pm 6.9$ ,而对于工程改造过的AXL组中的小鼠(S6-1-Fc),平均仅观察到 $8.3 \pm 1.6$ 个转移性病变(图15(上图))。对每只小鼠切除所有可见的病变且合起来称重以评估总体转移性肿瘤负荷。工程改造过的AXL治疗组(S6-1-Fc)又显示最显著的反应,因为E59R/T77R-Fc、野生型Fc和S6-1-Fc治疗组各自展现 $567 \pm 92$ 、 $430 \pm 36$ 和 $188 \pm 55$ mg的肿瘤负荷,图15(下图)。

[0205] 总之,这些发现进一步验证AXL为用于治疗转移的治疗靶且显示中和AXL的配体GAS6是一种有效的抗转移治疗策略。重要的是,不展现与Gas6的可检测结合的包含AXL-Fc融合体的蛋白质(AXL E59R/T77R-Fc)无法预防肿瘤转移;以中等亲和力结合于Gas6的包含AXL-Fc融合体的蛋白质(野生型AXL-Fc)显示轻微抑制肿瘤转移;以极强亲和力结合于Gas6的包含AXL-Fc融合体的蛋白质(AXL S6-1-Fc)显示显著抑制肿瘤转移。总之,这表明Gas6与AXL的相互作用的表位在肿瘤转移中至关重要且通过AXL S6-1-Fc蛋白有效抑制Gas6上的这一表位可显著抑制肿瘤转移。因而,AXL S6-1-Fc蛋白或任何有效阻断Gas6-Ax1相互作用的蛋白质均是有希望用于转移性疾病的治疗候选物。此外,也显示直接施用纯化过的可溶性AXL蛋白是一种可行的治疗方法,在临床上验证了这种方法。

[0206] 用于实例3的方法

[0207] 细胞系。将卵巢SKOV3ip.1在37°C下,在5%CO<sub>2</sub>孵育器中,在补充有10%胎牛血清和1%青霉素和链霉素的适当培养基中培养。

[0208] AXL-Fc融合体。将全长AXL突变体、氨基酸19-440接种到CMV驱动的pADD2腺病毒穿梭载体中与IgG2a Fc区形成直接融合体。使用来自Life Technologies的Freestyle表达试剂盒,如制造商所述实现人类胚胎肾(HEK)293细胞的瞬时DNA转染。5天后使用蛋白A亲和色谱法和尺寸排阻色谱法从培养物上清液纯化Fc-融合蛋白。纯化过的蛋白质放置于磷酸盐缓冲盐水溶液中而无任何额外添加剂或载体。

[0209] SKOV3ip.1腹膜异种移植。所有涉及动物和其管理的程序均由斯坦福大学的机构动物管理与使用委员会根据机构和NIH准则批准。对6周大的雌性裸小鼠腹膜内注射 $1 \times 10^6$ 个SKOV3ip.1细胞。施用细胞后7天,将小鼠随机分成3个用S6-1-Fc、野生型AXL-Fc或E59R/T77R-Fc治疗的组。纯化过的可溶性AXL-Fc蛋白经腹膜内注射以10mg/kg的剂量一周施用2次。给药持续3周,之后处死小鼠。进行尸检,其中对转移性病变计数且接着切除以合起来称重。肿瘤负荷是通过每只小鼠的所有患病组织的总病变数目和总体重量来确定。

[0210] 统计学分析:使用斯氏t检验且所报道的误差为平均值的标准误差(SEM)。p值<



0.01的值被认为具有显著性。

[0211] 虽然前述发明已通过说明和举例相当详细地描述以达成清晰了解的目的,但本领域技术人员根据本发明的教导显而易见的是,可在不偏离所附权利要求的精神或范围的情况下进行某些改变和修改。

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 894

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

[0001] 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 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  
 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

[0002]

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | 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 |     |     |     |
| [0003] | 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 |     |     |     |     |     |     |

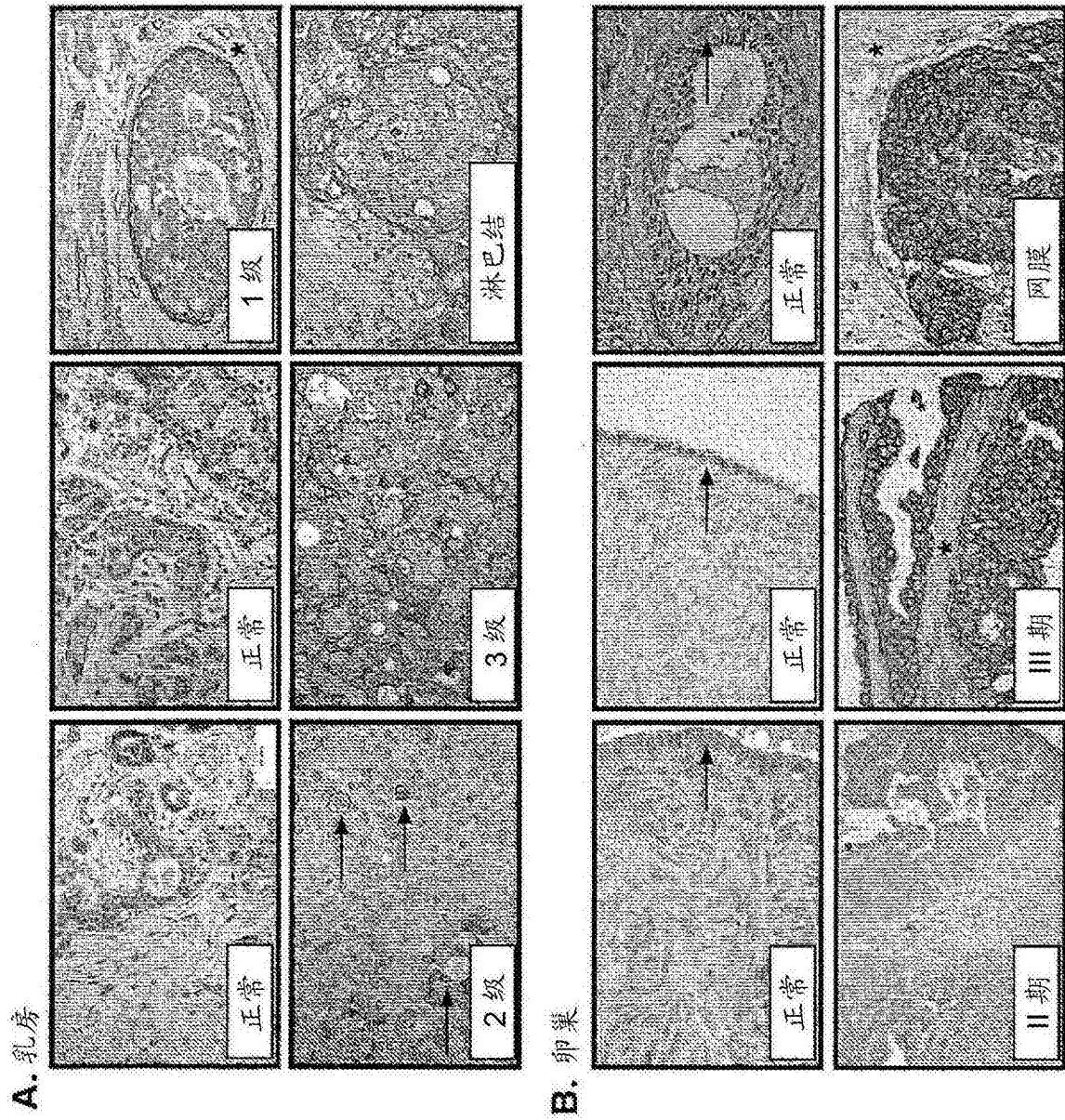


图1

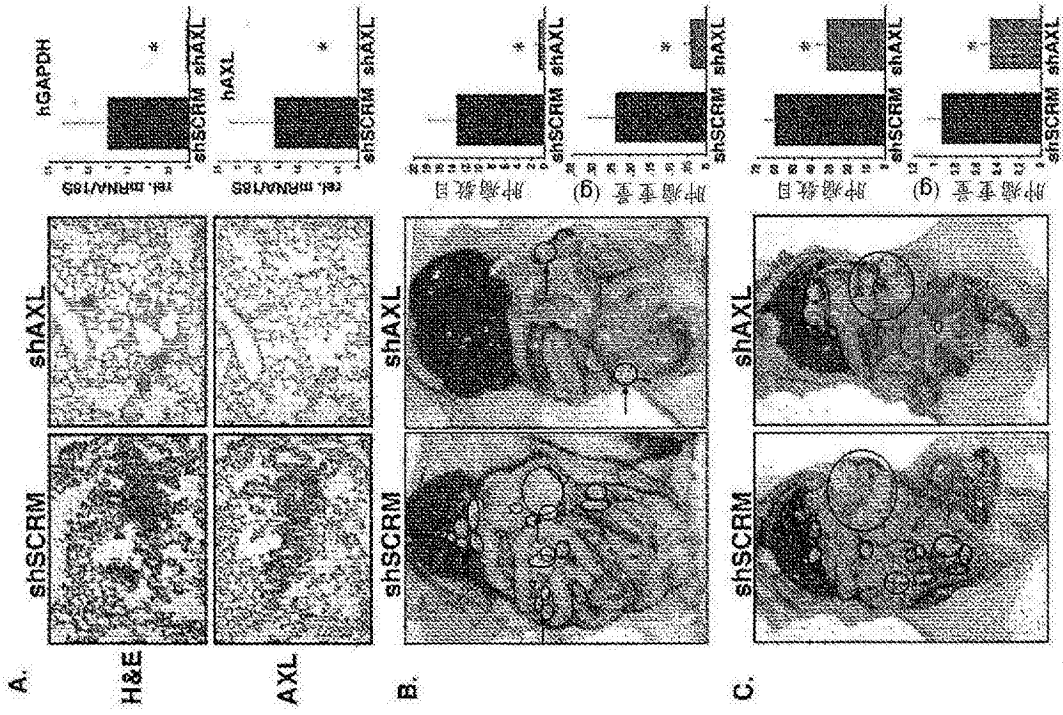


图2

卵巢

乳房

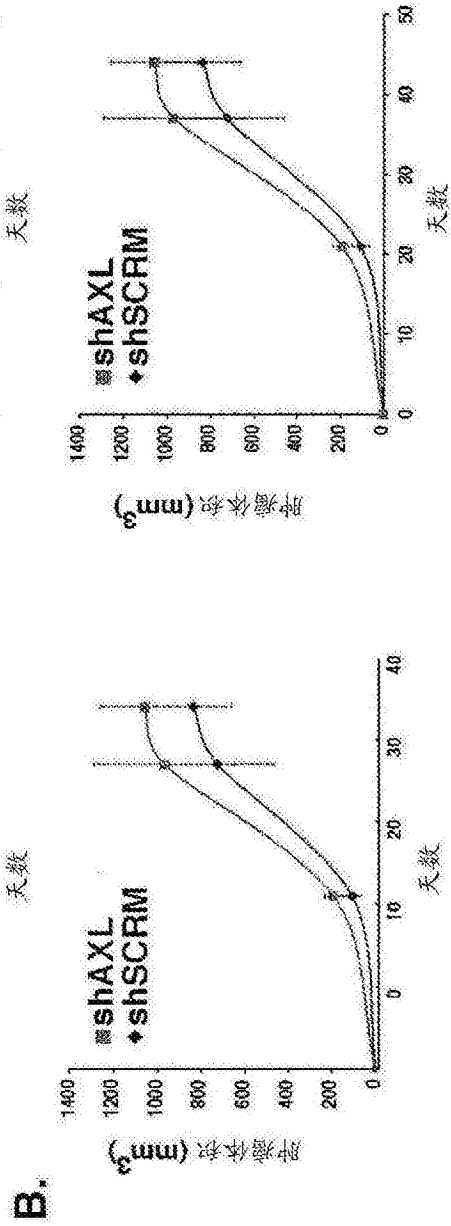
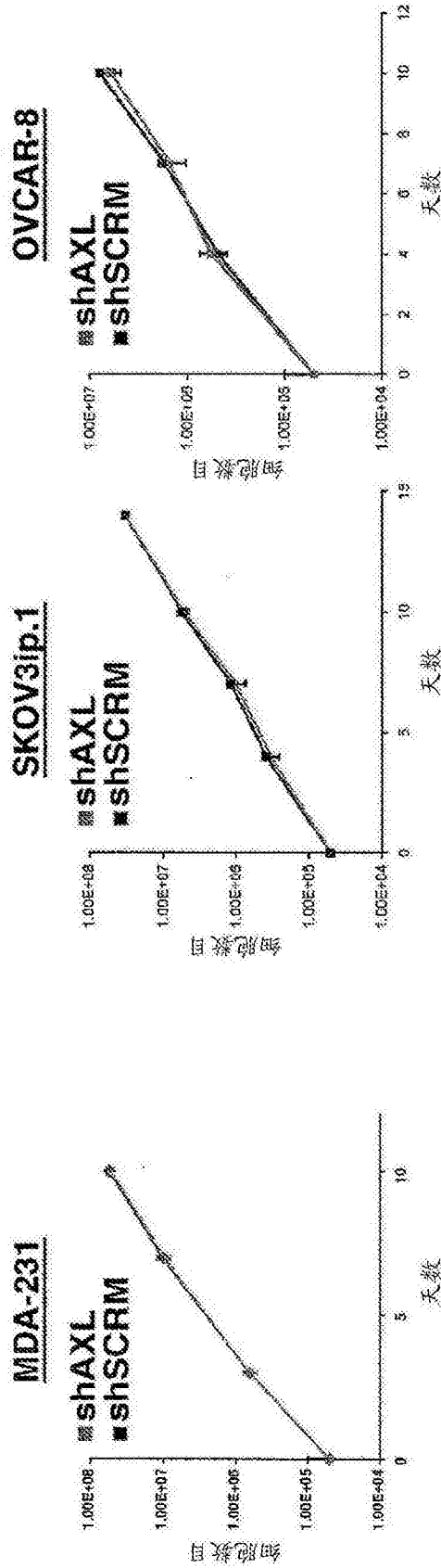


图3

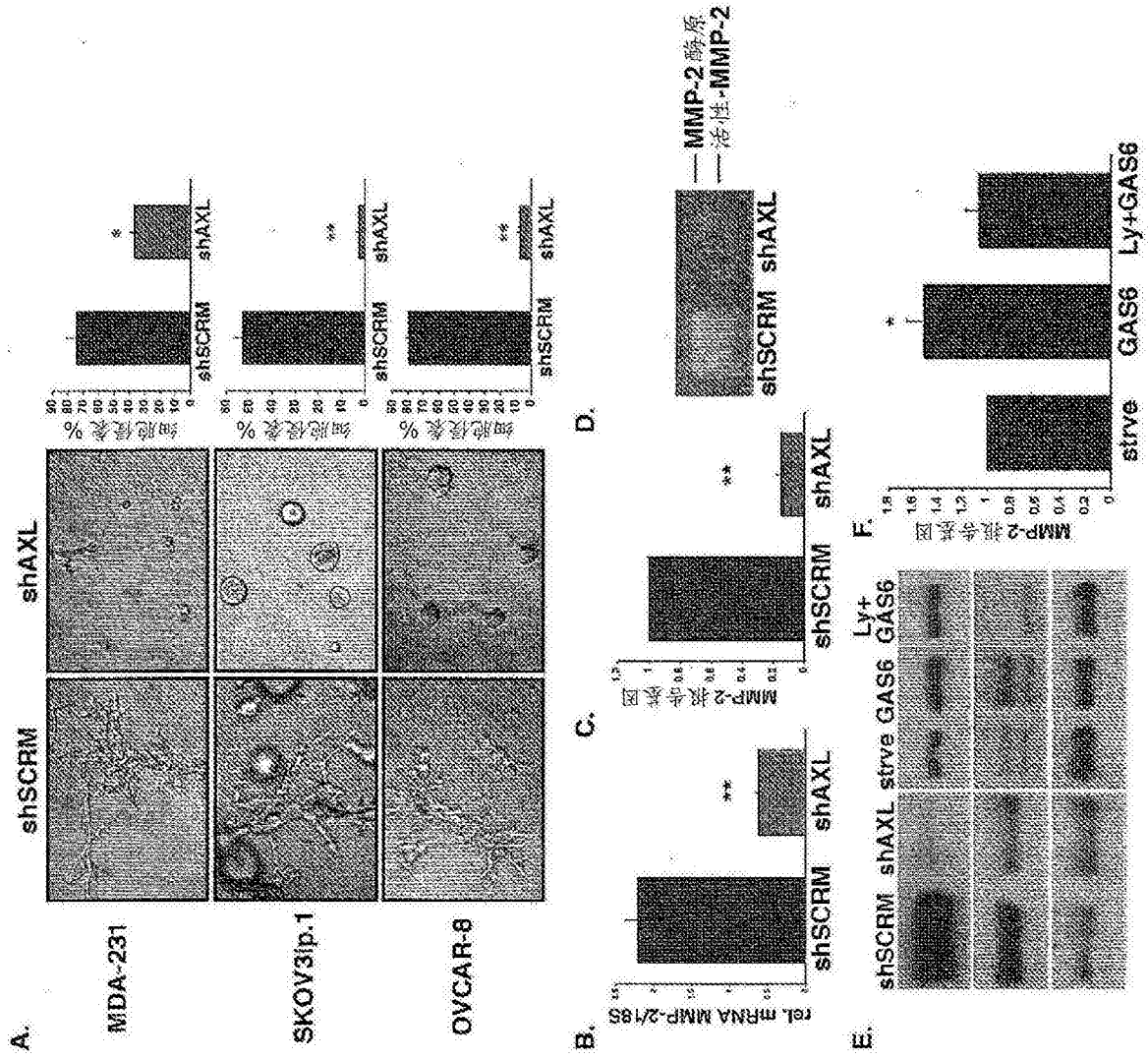


图4



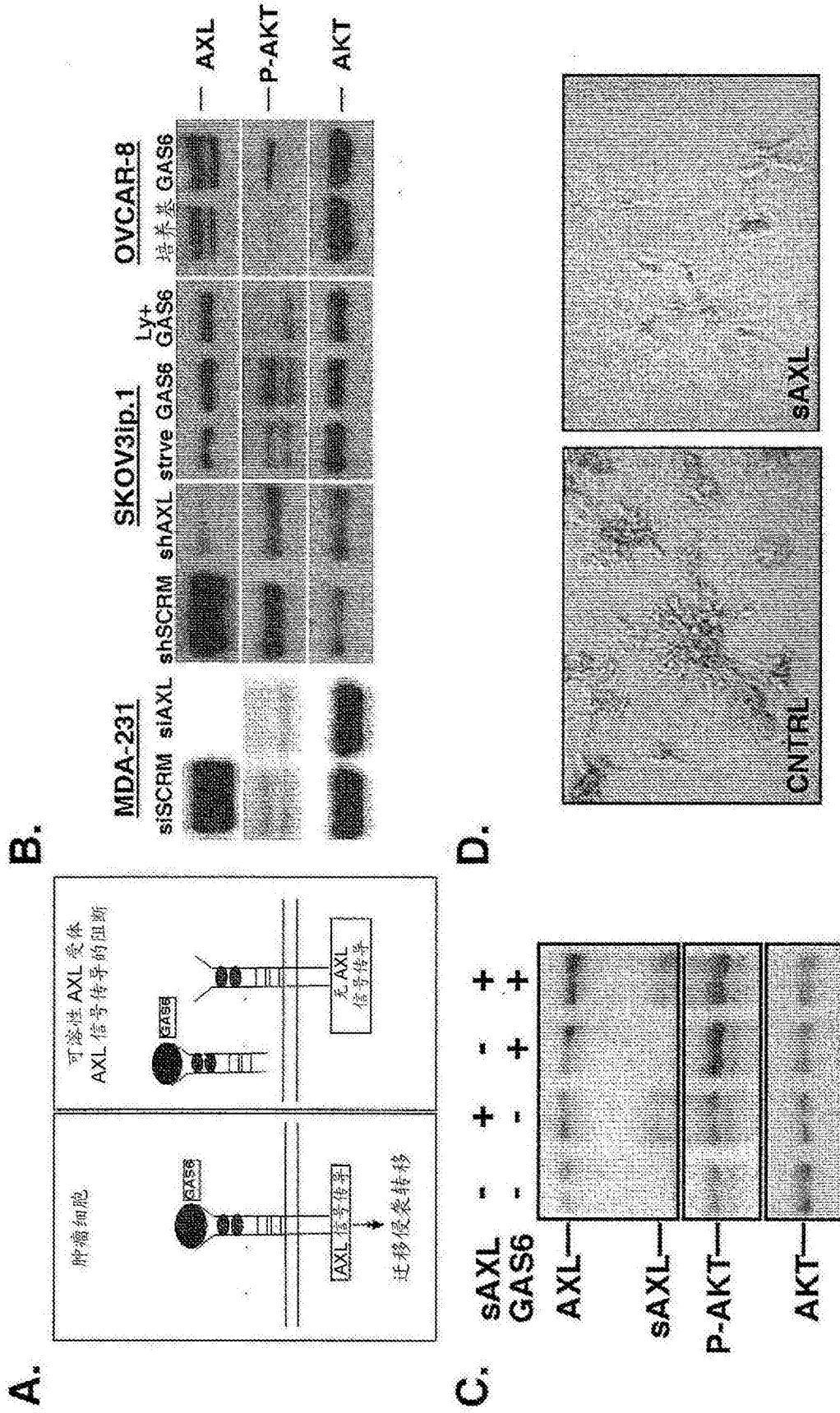


图5

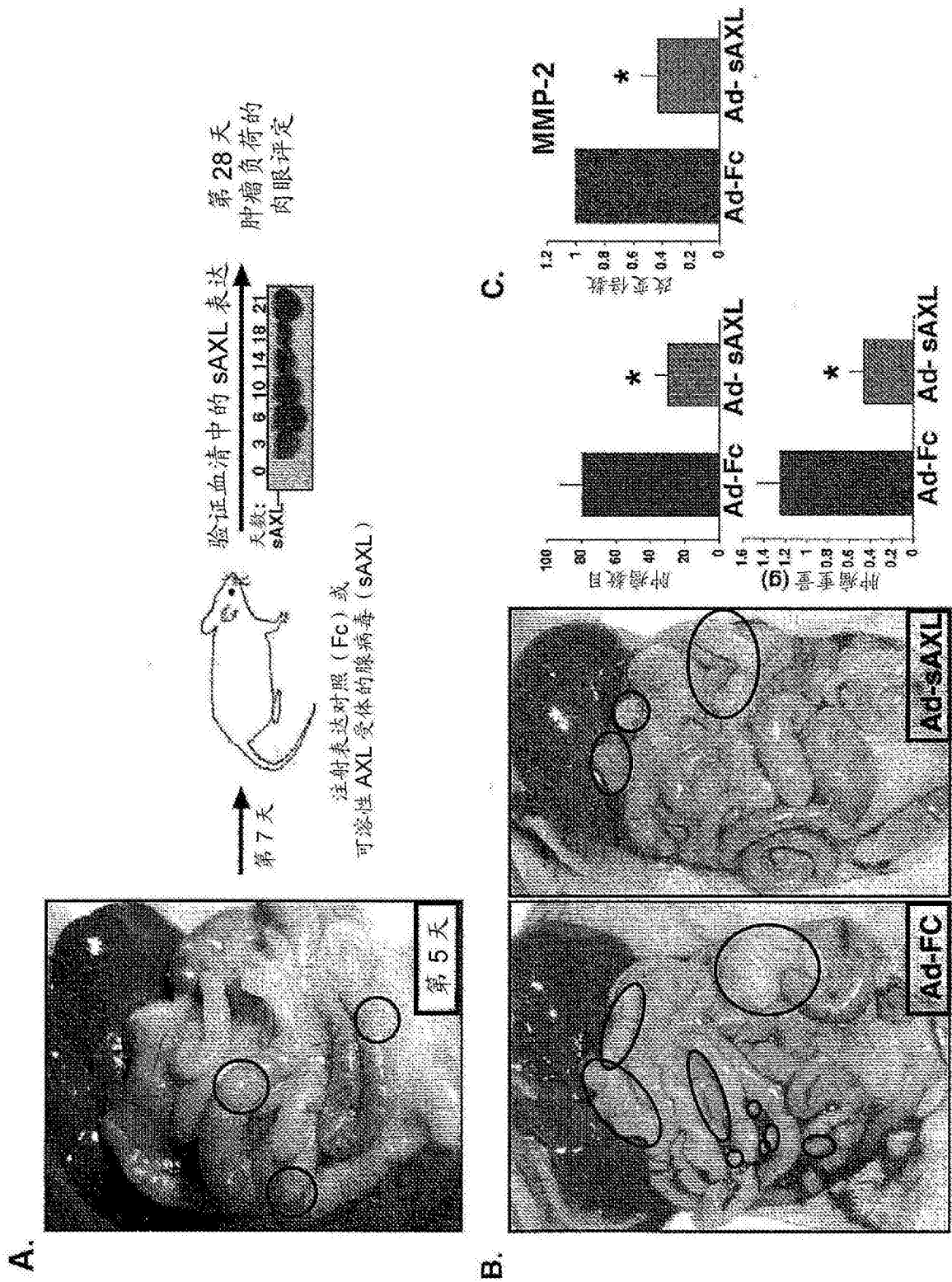


图6

| 参数          | Fc          | AXL        | 正常范围        |
|-------------|-------------|------------|-------------|
| <b>肝</b>    |             |            |             |
| ALT (U/L)   | 83 +/- 31   | 64 +/- 7   | 76 - 160    |
| AST (U/L)   | 242 +/- 195 | 127 +/- 18 | 192 - 388   |
| <b>肾</b>    |             |            |             |
| BUN (mg/dL) | 23 +/- 8    | 23 +/- 1   | 20.3 - 24.7 |
| 肌酐 (mg/dL)  | 0.3 +/- 0.1 | 0.3 +/- 0  | 0.1 - 1.1   |
| <b>血液学</b>  |             |            |             |
| HCT (%)     | 41 +/- 0.5  | 41 +/- 0.5 | 39 - 47     |
| RBC (M/u)   | 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   |

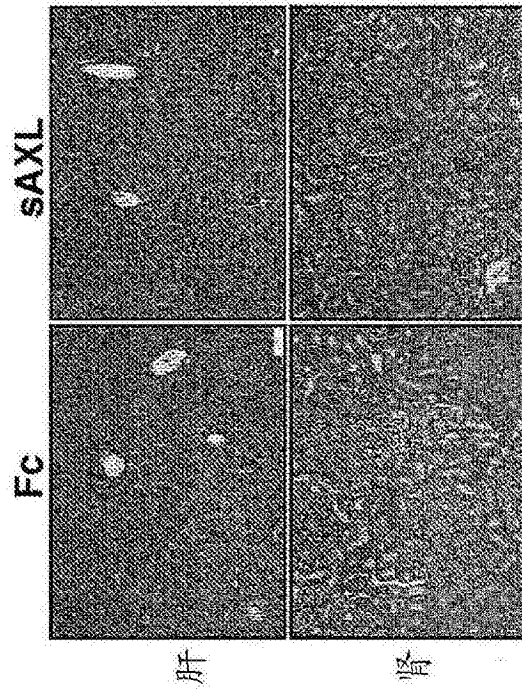


图7

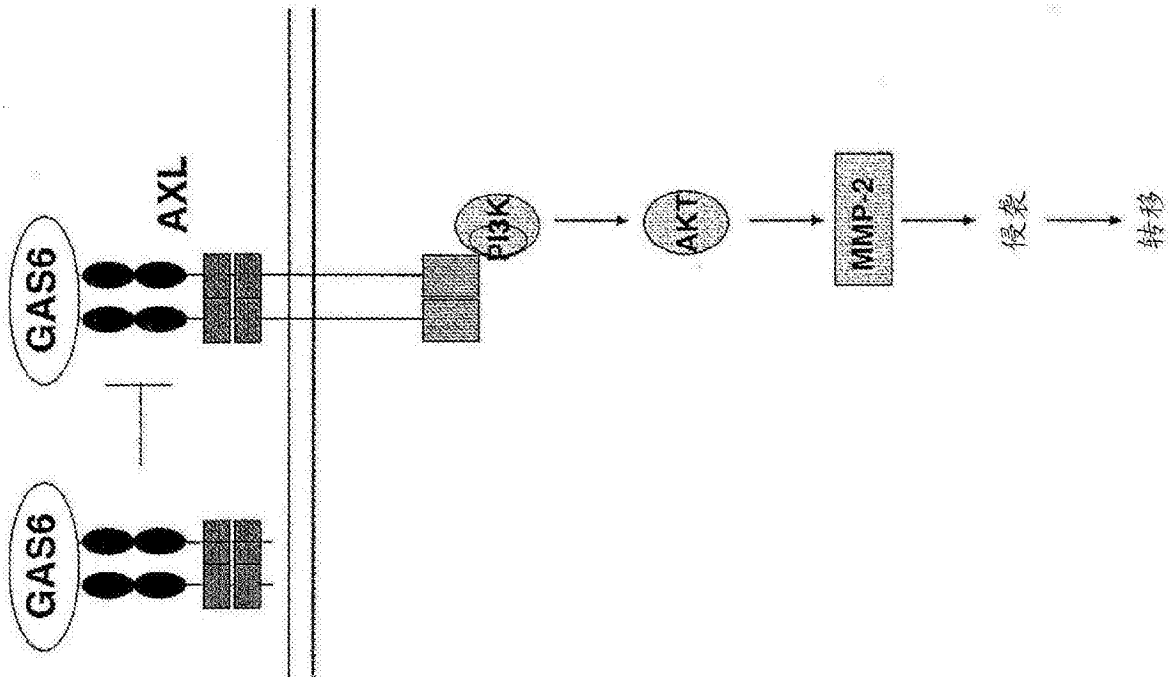


图8

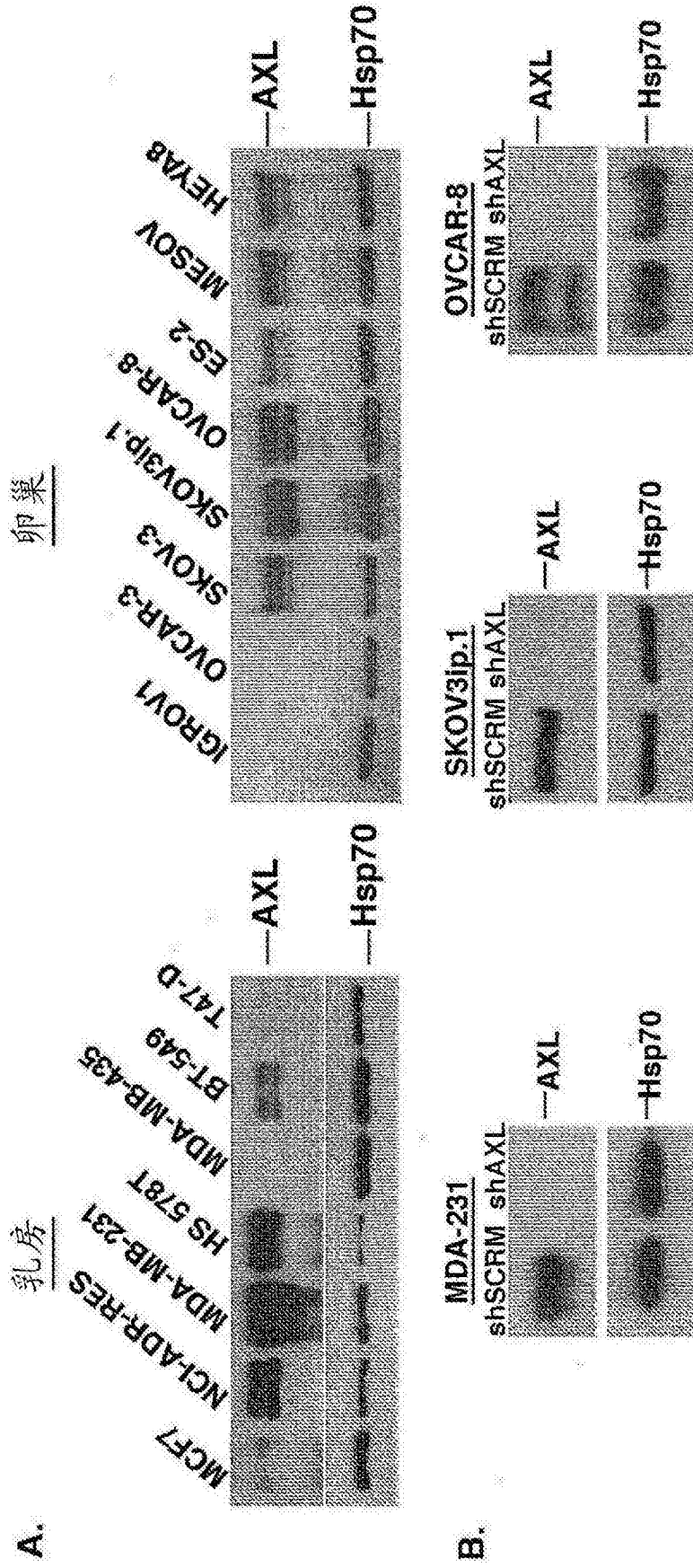


图9

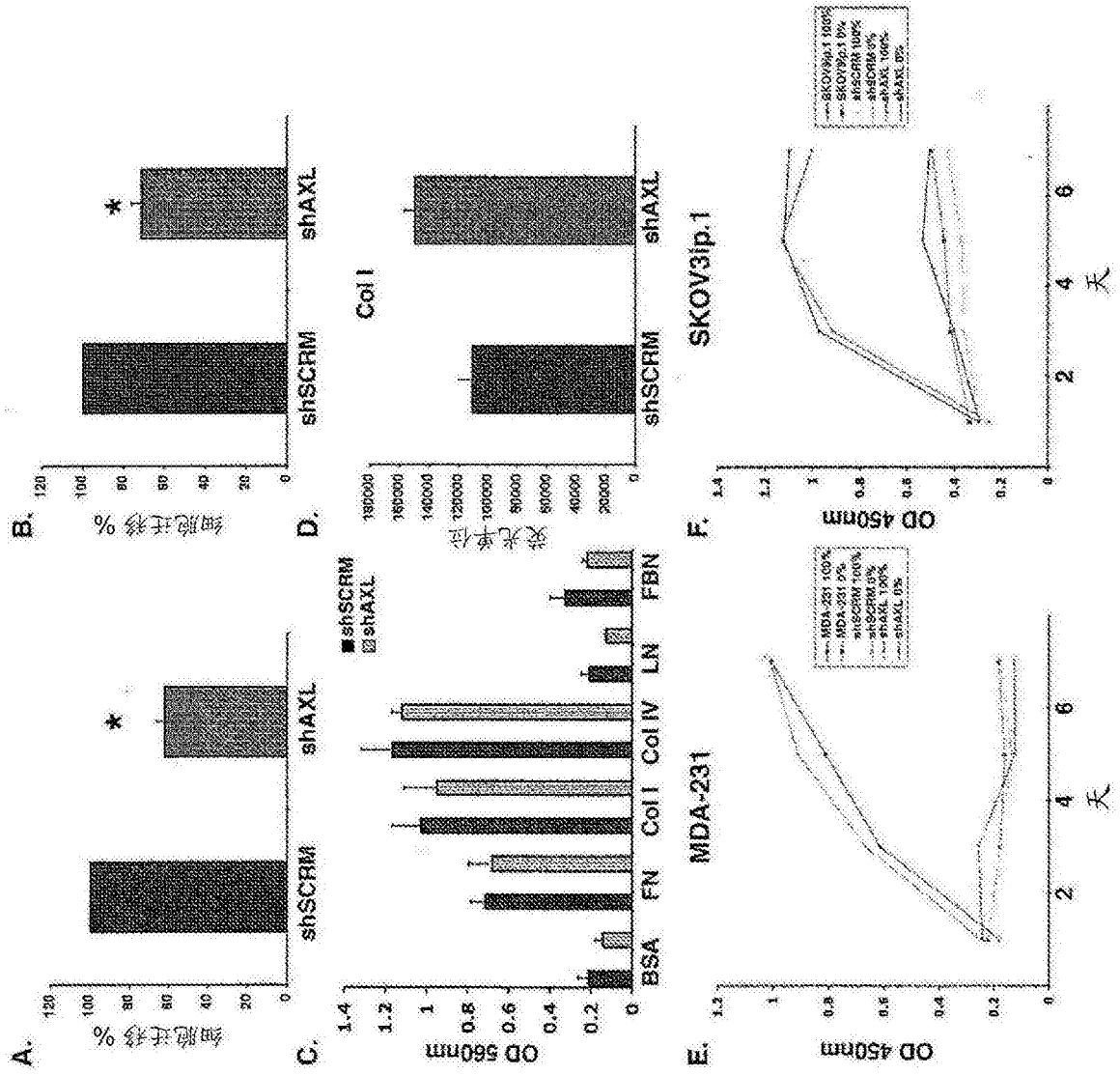


图10

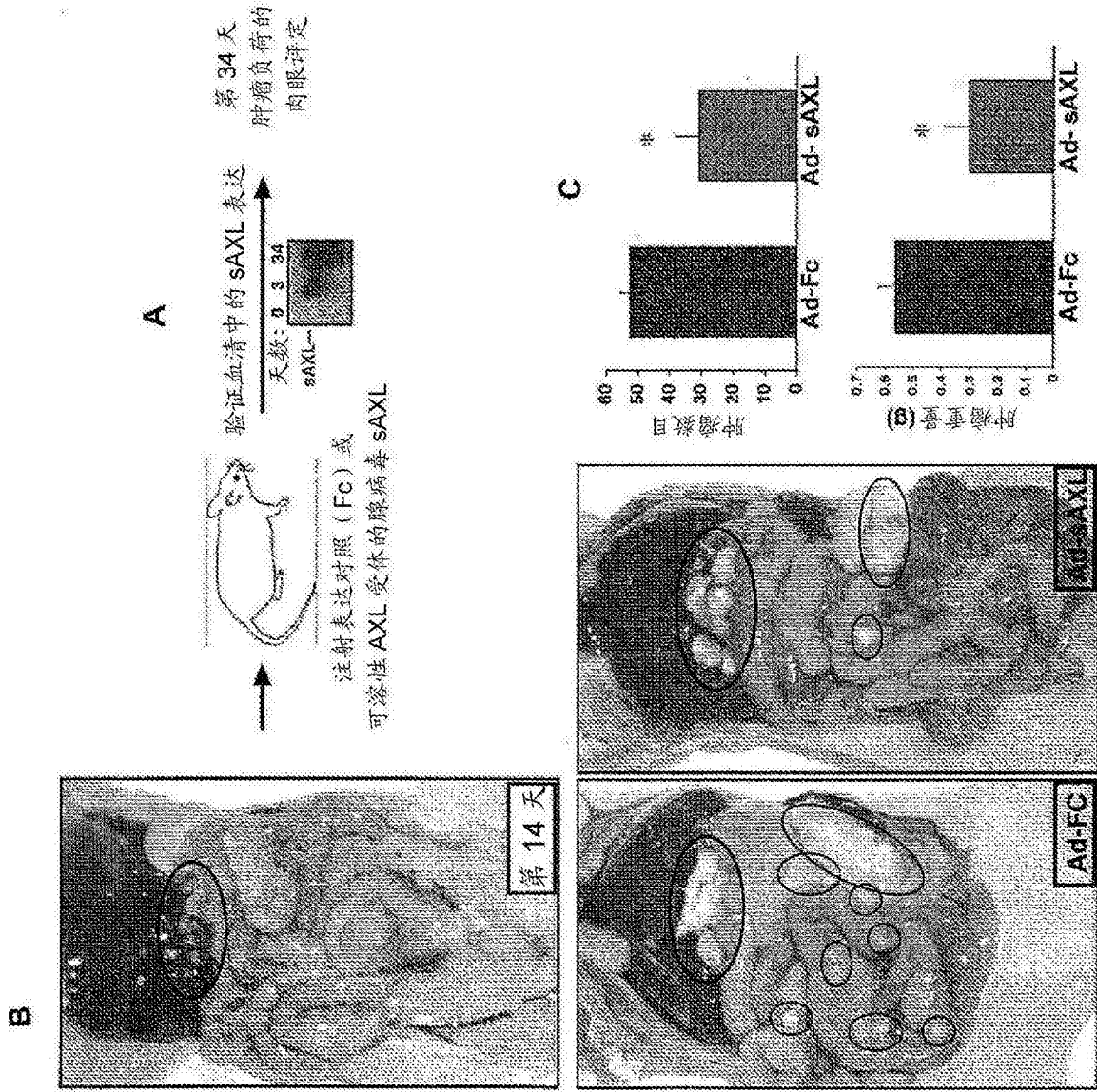


图11

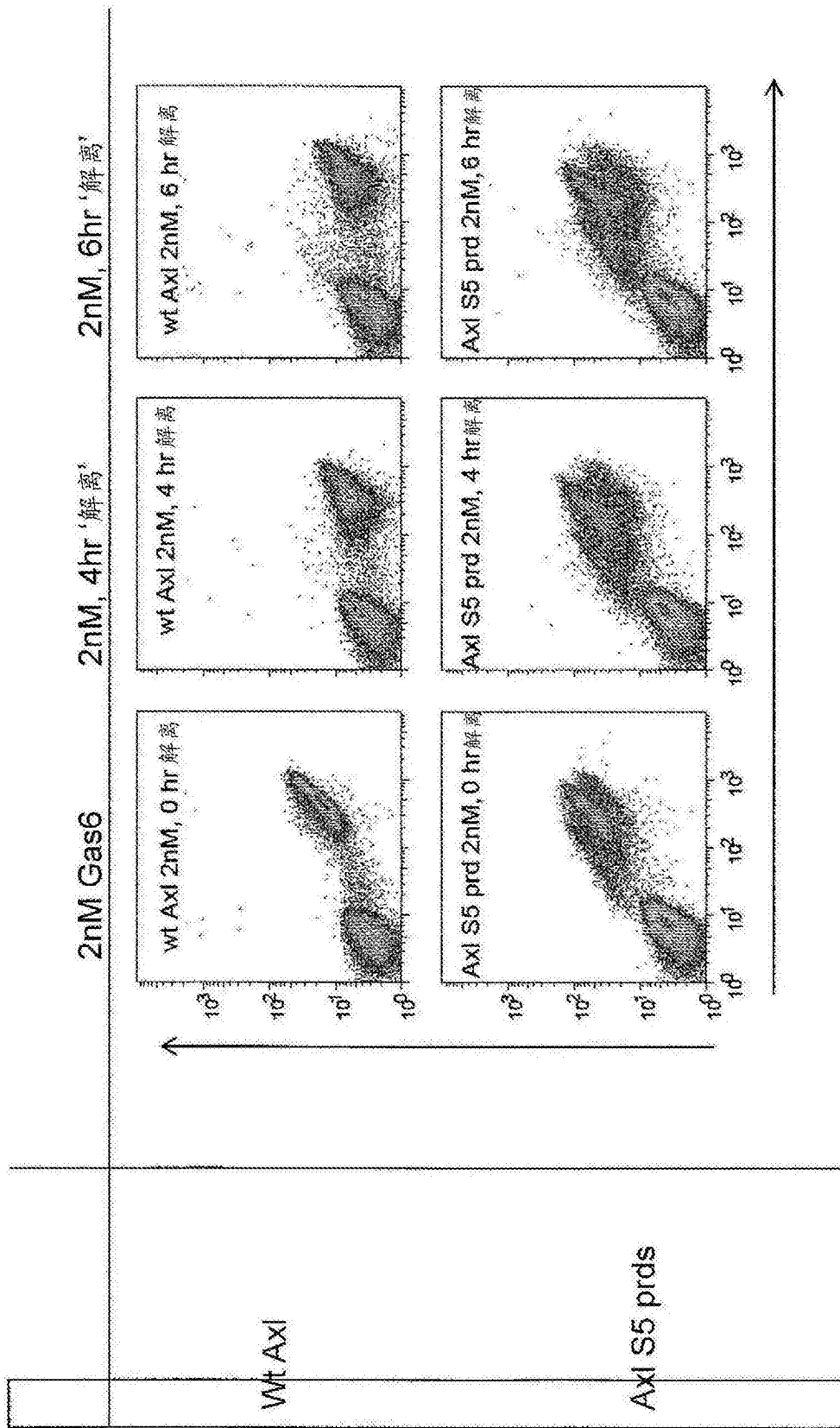


图12A

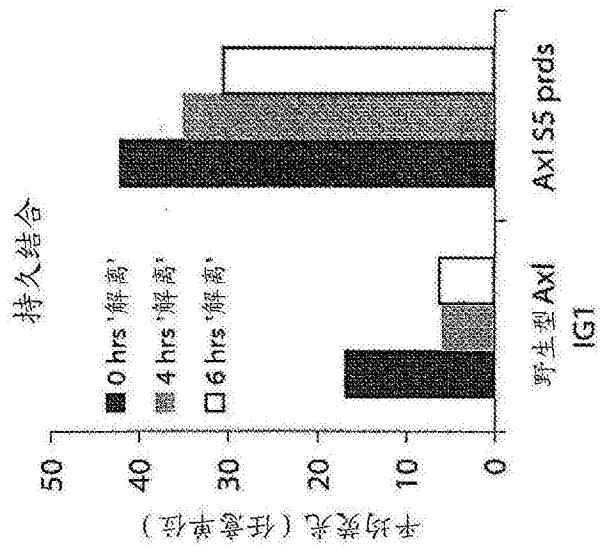


图12B



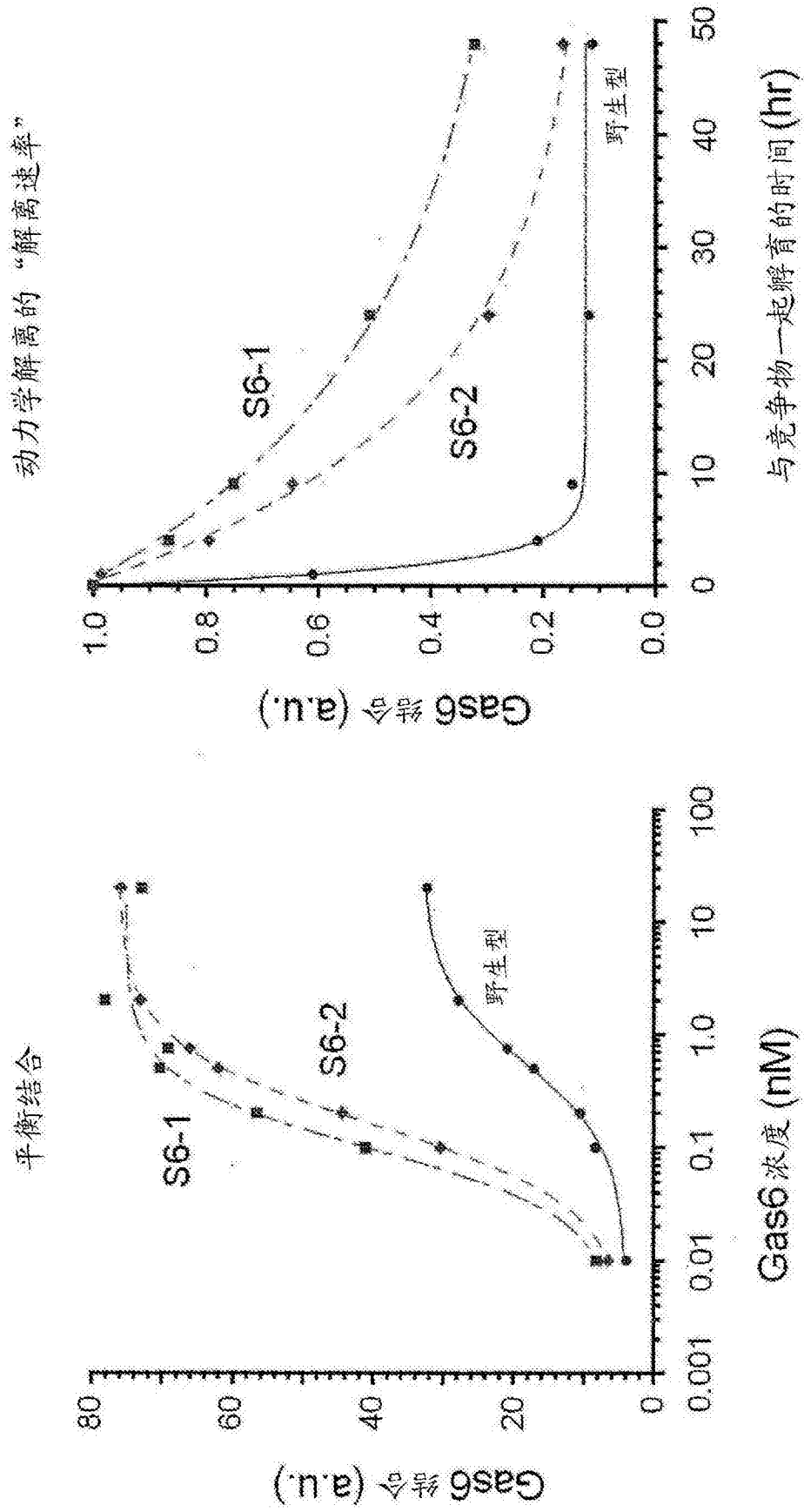


图13

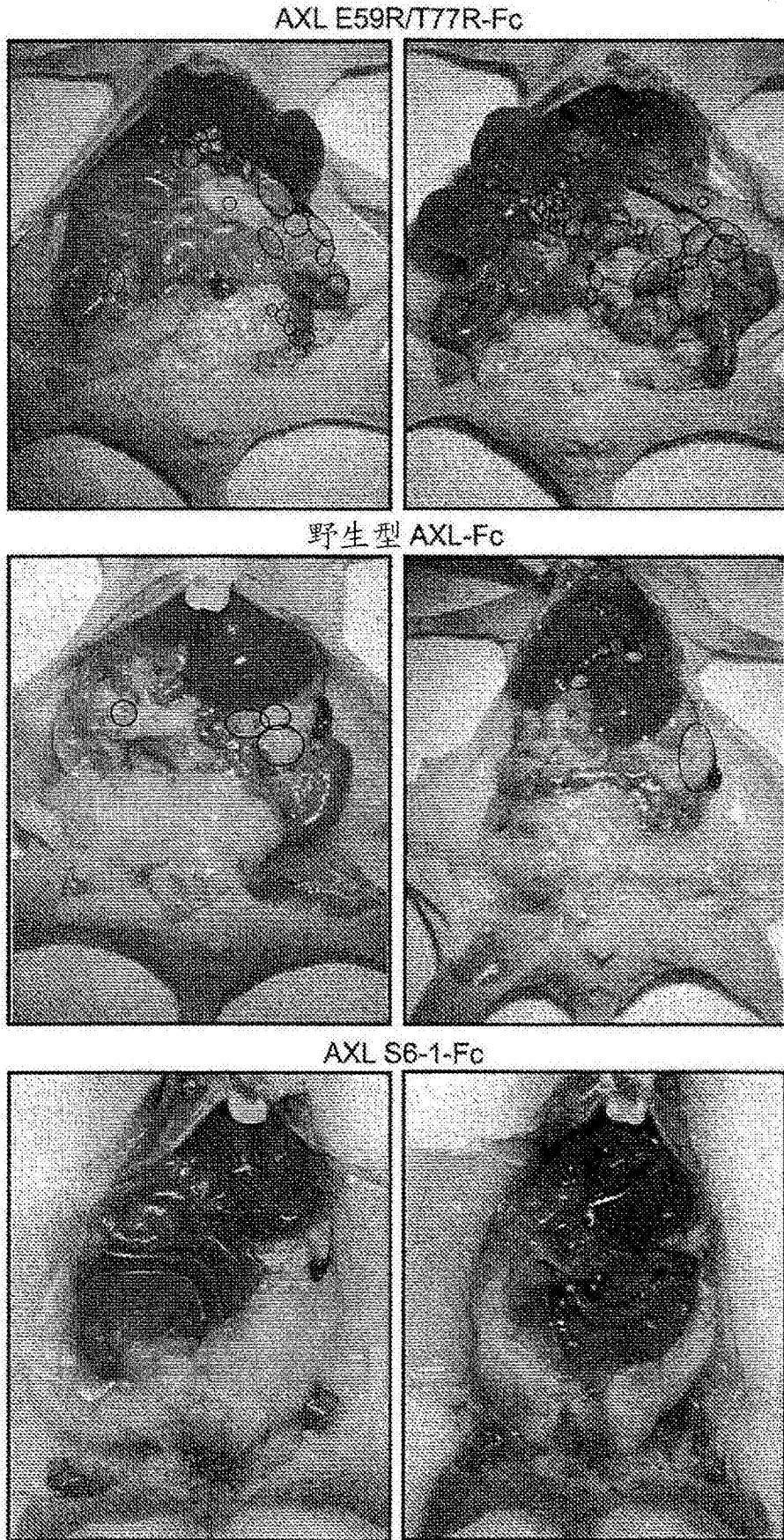
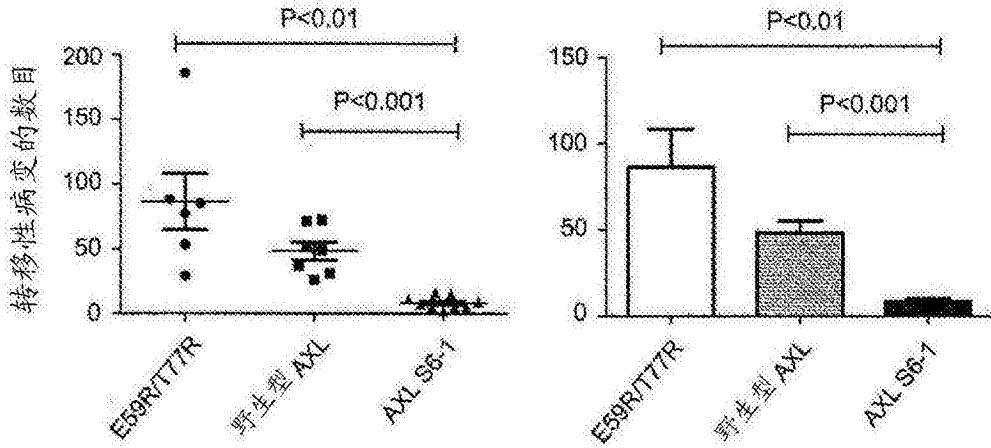


图14

在具有 SKOV3ip.1 卵巢肿瘤的小鼠体内用 sAXL-Fc 蛋白治疗

通过病变数目评估的转移性肿瘤负荷



通过病变数目评估的转移性肿瘤负荷

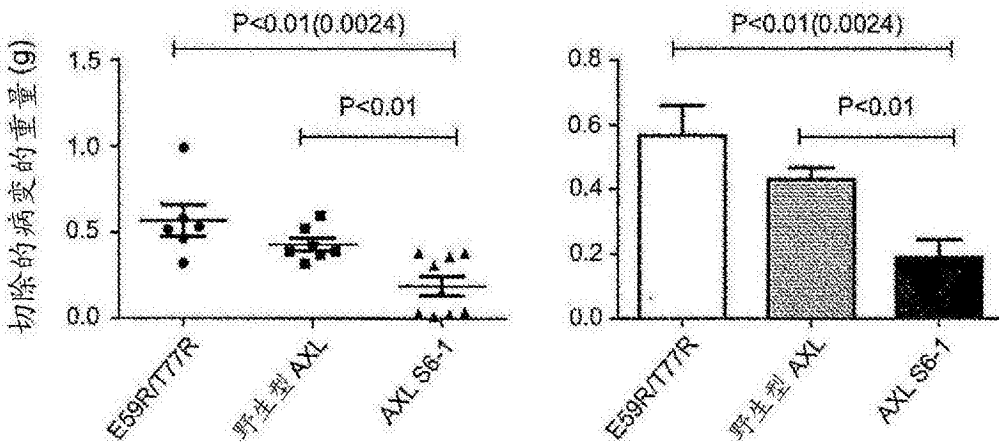


图15