



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	102010901879869
Data Deposito	12/10/2010
Data Pubblicazione	12/04/2012

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

APTAMERO INIBITORE DEL RECETTORE TIROSINA CHINASI AXL PER USO IN TERAPIA
--

DESCRIZIONE

Parte formante una domanda di brevetto dell'invenzione industriale dal titolo:

“APTAMERO INIBITORE DEL RECETTORE TIROSINA CHINASI AXL DA UTILIZZARE IN TERAPIA”

5 Richiedente: Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Inventori: Vittorio de Franciscis, Laura Cerchia

Settore dell'invenzione

10 L'invenzione è relativa all'identificazione di un aptamero nucleotide e del suo bersaglio, il recettore tirosina chinasi Axl. L'aptamero agisce da inibitore del recettore tirosina chinasi Axl ed è quindi idoneo per uso nel trattamento e/o nella diagnosi di un disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl.

Stato della tecnica

La rapida espansione delle nuove tecnologie per la diagnostica molecolare e la terapia a bersaglio dei tumori ha aumentato la necessità di sviluppare ligandi a bersaglio altamente specifici per molecole sulla superficie cellulare che sono espresse in modo differente nelle
20 cellule o nei tessuti tumorali.

Axl è un membro di una famiglia di recettori tirosina chinasi (RTK) che include anche Dtk e Mer (Hafizi e Dahlbäck, 2006) ed è attivato dal fattore di crescita, fattore specifico arresto della crescita 6 (GAS6). La stimolazione di Axl indotta dal ligando media l'attivazione di molteplici vie di segnalazione a valle che svolgono ruoli fondamentali nella
25 regolazione della crescita, nella proliferazione e nella sopravvivenza.

Axl è stato originariamente identificato come un gene trasformante in pazienti con leucemia mielogena cronica (O'Bryan et al., 1991; Janssen et al., 1991). Successivamente, il percorso di segnalazione di Gas6-Axl è stato implicato in una perdita di risposte cellulari discrete, ivi incluse sopravvivenza, proliferazione, migrazione e adesione cellulare (Linger
30 et al., 2008). La sovraespressione di Axl è stata associata ad invasività e metastasi in un'ampia gamma di cancro umani, ivi inclusi il cancro del polmone (Shieh et al., 2005), della prostata (Sainaghi et al., 2005), del seno (Meric et al., 2002; Zhang et al., 2008), gastrico (Wu et al., 2002) e pancreatico (Koorstra et al., 2009), il carcinoma cellulare

renale (Chung et al., 2003) così come il glioblastoma (Vajkoczy P, et al., 2006; Hutterer et al., 2008).

Questi dati indicano che il percorso di segnalazione di Axl rappresenta una nuova classe di bersagli per lo sviluppo di una terapia tumorale.

- 5 Una nascente varietà di molecole terapeutiche a bersaglio contro RTKs è costituita da aptameri a base di acidi nucleici. Essi sono ligandi di brevi RNA o DNA a singolo filamento strutturati, che si legano con elevata affinità alle loro molecole bersaglio. Gli aptameri sono isolati mediante la tecnologia di Evoluzione Sistemica dei Ligandi mediante arricchimento Esponenziale (SELEX) che dalla sua prima descrizione nel 1990
- 10 (Ellington e Szostak, 1990; Tuck e Gold, 1990), ha fornito vari ligandi con elevata affinità di un'ampia gamma di bersagli che vanno dai piccoli composti chimici alle cellule e ai tessuti (Cerchia et al., 2002; Cerchia e de Franciscis, 2010).

- Gli aptameri si stanno sviluppando ora come promettenti molecole per colpire specifici epitopi del cancro nella diagnosi e nella terapia clinica. Grazie alla loro elevata specificità
- 15 e bassa tossicità, gli aptameri potrebbero essere considerati i composti preferiti per il riconoscimento cellulare in vivo. Con questa prospettiva, gli aptameri di acidi nucleici rappresentano una classe di ligandi che può superare gli anticorpi per quanto riguarda specificità e affinità per il bersaglio, associata inoltre a basse cinetiche di degradazione e bassa tossicità. Inoltre, gli aptameri possono essere facilmente chimicamente modificati
- 20 mediante aggiunta di glicole polietilenico e altre molecole per potenziare la loro biodisponibilità e le farmacocinetiche.

- Attualmente, è stato riportato che solo pochi inibitori di Axl sono completamente non associati all'aptamero anti-Axl, sia dal punto di vista strutturale che per la modalità di azione: 1) inibitori a piccole molecole, come R428, che blocca le attività catalitiche di Axl
- 25 (Holland et al., 2010; Zhang et al., 2008); 2) un anticorpo monoclonale anti-Axl che blocca il ligando Gas6 che si lega al recettore (Ye et al., 2010); 3) proteine derivate dal dominio extracellulare di Axl che inibiscono la sua azione competendo per il legame al ligando (GAS6) (Domanda di Brevetto Internazionale WO2008098139).

- La presente invenzione ha identificato un aptamero, GL21 52-85, che può risolvere i
- 30 principali problemi associati all'utilizzo in vivo degli inibitori dell'arte antecedente. L'aptamero GL21 52-85 è altamente specifico per il recettore Axl mentre R428 è efficace non solo su Axl ma anche su altre tirosina e serina/treonina chinasi (vale a dire Tie-2, Flt-1, Flt-3, Ret, Abl). Rispetto agli anticorpi anti-Axl, sia gli anticorpi che l'aptamero anti-Axl

hanno affinità di legame nell'intervallo del nanomolare inferiore. Tuttavia, l'aptamero non ha immunogenicità, mentre gli anticorpi nell'uomo sono significativamente immunogenici, quindi viene precluso il ripetuto dosaggio a meno che di "umanizzarli" o di produrli completamente umani. Gli agenti terapeutici a base di RNA sono quindi probabilmente più sicuri quando sono necessarie somministrazioni ripetute. Inoltre, l'aptamero contiene pirimidine modificate in posizione 2', il che rende l'RNA resistente alle nucleasi extracellulari e ancora meno immunogenico rispetto all'RNA naturale. Peraltro, l'aptamero può essere facilmente chimicamente modificato mediante aggiunta chimica di glicole polietilenico (PEG) e altre molecole per potenziare la biodisponibilità e le proprietà farmacocinetiche. Poiché gli aptameri sono sintetizzati mediante sintesi chimica in fase solida, la chimica della coniugazione è possibile in qualsiasi posizione nella molecola a differenza delle proteine e dei peptidi che possono accettare la coniugazione solo su specifici residui.

Secondariamente, GL21 52-85 offre vari vantaggi rispetto agli anticorpi monoclonali grazie alla sua specificità e affinità per il bersaglio, basse cinetiche di degradazione e bassa tossicità.

Breve Descrizione dell'invenzione

Nella presente invenzione, gli autori hanno identificato un aptamero RNA sintetico resistente alle nucleasi lungo 34 nucleotidi, chiamato GL21 52-85, che si lega al recettore Axl con elevata affinità provocando inibizione della proliferazione cellulare *in vitro* e *in vivo*.

I risultati degli autori indicano che questo RNA-aptamero neutralizzante rappresenta uno strumento innovativo per lo sviluppo di strategie per la terapia e la diagnosi del cancro che hanno come specifico bersaglio il recettore Axl.

È perciò oggetto dell'invenzione un aptamero nucleotide avente essenzialmente la sequenza: 5'-AUGAUCAAUCGCCUCAAUUCGACAGGAGGCUCAC-3' per uso come trattamento e/o prevenzione o per la diagnosi di un disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl.

Preferibilmente l'aptamero nucleotide è resistente alle nucleasi. Inoltre preferibilmente l'aptamero nucleotide ha almeno uno o tutti residui di pirimidina modificati in 2'-fluoropirimidine. Nella presente invenzione, i residui di pirimidina possono anche essere

modificati come 2'-O-alchil nucleotidi, o cap all'estremità 3' e acidi nucleici locked o come modifiche LNA per potenziare significativamente la stabilità dell'RNA.

Preferibilmente, il disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl è causato da, associato a e/o accompagnato da iperfunzione di Axl chinasi.

- 5 Ancora preferibilmente, il disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl è selezionato tra i disordini iperproliferativi.

In una forma di realizzazione preferita, il disordine iperproliferativo indotto dal recettore tirosina chinasi Axl è selezionato dal gruppo costituito da cancro o metastasi tumorale primaria.

- 10 Inoltre preferibilmente, il cancro o metastasi tumorale primaria è selezionato dal gruppo di: cancro del seno, cancro della prostata, cancro del polmone, cancro gastrico, cancro ovarico, cancro dell'endometrio, cancro renale, cancro epatocellulare, cancro della tiroide, cancro all'utero, carcinoma esofageo, carcinoma a cellule squamose, leucemia, osteosarcoma, melanoma, glioblastoma, neuroblastoma, o metastasi tumorale primaria.

- 15 Un ulteriore oggetto dell'invenzione è una composizione farmaceutica comprendente l'aptamero nucleotide come definito sopra da utilizzare come trattamento e/o prevenzione di un disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl.

Preferibilmente, la composizione farmaceutica ulteriormente comprende un altro agente terapeutico.

- 20 Un ulteriore oggetto dell'invenzione è un metodo per la diagnosi di un disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl in un paziente da cui è stato ottenuto un campione comprendente:

- incubazione del campione con l'aptamero nucleotide come definito sopra;
- misurazione del legame dell'aptamero nucleotide con il campione.

- 25 Preferibilmente, il campione è un campione di sangue, siero o saliva, una biopsia, urina o fluido cerebrospinale.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è un kit per la diagnosi di un disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl in un paziente da cui è stato ottenuto un campione comprendente l'aptamero nucleotide della presente invenzione.

- 30 L'invenzione sarà ora illustrata mediante esempi non limitativi, facendo riferimento alle seguenti figure.

Figura 1. Aptamero GL21 52-85. A) Sequenza nucleotidica dell'aptamero GL21 52-85. Tutte le pirimidine della sequenza sono 2'-fluoropirimidina (2'F-Py), evidenziate con una

sottolineatura B) Struttura secondaria predetta per l'aptamero GL21 52-85 usando il software MFOLD versione 3.1 (disponibile da <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>).

Figura 2. Legame dell'aptamero GL21 52-85 in seguito a silenziamento/espressione

del gene Axl. A) Legame dell'aptamero GL21 52-85 su cellule di glioma U87MG transfettate con uno specifico shRNA di Axl (shRNA Axl) o con un shRNA non associato (shRNActrl) che non ha come bersaglio Axl, come controllo. **A1)** I lisati cellulari da cellule U87MG transfettate con uno specifico shRNA di Axl o shRNA di controllo sono stati sottoposti a immunoblotting con anticorpi anti-Axl (Axl). I filtri sono stati strappati e sondati nuovamente con anticorpi anti- α -tubulina per confermare il carico uguale. Valori sotto i blot indicano i livelli di segnale relativi al controllo arbitrariamente fissati a 1 (segnati con asterisco). L'intensità delle bande è stata calcolata usando il Programma di Immagini NIH su almeno due differenti esposizioni per assicurare la linearità di ogni acquisizione. **B)** legame dell'aptamero GL21 52-85 su SKBr3 di seno transfettate (o meno) con Axl. **B1)** I lisati cellulari da cellule U87MG o SKBr3 transfettate (o meno) con Axl sono stati sottoposti a immunoblotting con anticorpi contro Axl. Per confermare il carico uguale, i filtri sono stati sondati nuovamente con anticorpi anti- α tubulina. In A e B) il legame è stato realizzato incubando l'aptamero marcato con [32 P] sulle cellule nelle stesse condizioni a 50 nM. I risultati sono espressi relativamente al legame di fondo rivelato con un aptamero non correlato non funzionale come controllo negativo.

Figura 3. Legame dell'aptamero GL21 52-85 su differenti cellule cancerose. A) I lisati cellulari da linee cellulari indicate sono stati sottoposti a immunoblotting con anticorpi anti-Axl (Axl). I filtri sono stati strappati e nuovamente sondati con anticorpi anti- α tubulina per confermare il carico uguale. **B)** Il legame dell'aptamero GL21 52-85 sulle linee cellulari indicate, è stato realizzato incubando l'aptamero [32 P]-marcato sulle cellule nelle stesse condizioni a 50 nM. I risultati sono espressi relativamente al legame di fondo rivelato con l'aptamero non correlato.

Figura 4. Legame su recettori purificati Axl e Dtk. L'aptamero GL21 52-85 è stato incubato con A) il dominio extracellulare solubile di Axl (EC-Axl) e B) il dominio extracellulare solubile di Dtk (EC-Dtk). Le costanti di dissociazione (valori Kd) dell'aptamero sono state calcolate come riportato in Materiali e Metodi.

Figura 5. L'aptamero GL21 52-85 inibisce l'attività di Axl. A) Cellule U87MG sono state trattate con GL21 52-85 o aptamero non correlato per 3 ore; **B)** Le cellule U87MG

private di siero sono state o lasciate non trattate o trattate per 3 ore con GL21 52-85 o aptameri scrambled e poi stimulate con ligando Gas 6. In A e B, i lisati cellulari sono stati sottoposti a immunoblotting con anti-(fosfo)-Axl (pAxl), anti-Axl (Axl) o anti-(fosfo)-ERK (pErk), come indicato. I filtri sono stati strippati e nuovamente sondati con anticorpi anti-ERK (Erk) o anti- α tubulina per confermare il carico uguale. I valori sotto i blot indicano livelli di segnale relativi ai controlli stimolati con Gas6 arbitrariamente fissati a 1 (marcato con asterisco). L'intensità delle bande è stata calcolata usando il Programma di Immagini NIH su almeno due differenti esposizioni per assicurare la linearità di ogni acquisizione. C) Effetto sulla vitalità cellulare. Le cellule U87MG, A431 o MDA-MB-231 sono state lasciate non trattate o trattate per 24 ore con GL21 52-85 o aptamero non correlato ad una concentrazione finale 200nM. La vitalità cellulare è stata analizzata come riportato in Materiali e Metodi mediante saggio MTT. I risultati sono espressi relativamente a cellule non trattate arbitrariamente fissati al 100% di vitalità e sono rappresentativi di almeno tre differenti esperimenti. D) La motilità di cellule A549 è stata analizzata mediante il saggio di migrazione in camera di Boyden per 24 ore contro mezzo privo di siero contenente Gas6 come chemioattraente. Le cellule che sono migrate verso la superficie inferiore sono state colorate con cristalvioletto e fotografate.

Figura 6. L'aptamero GL21 52-85 inibisce la crescita tumorale. L'aptamero GL21 52-85 o l'aptamero non correlato sono stati somministrati intratumoralmente in un modello di topo xenograft avente le cellule del tumore al seno MDA-MB-231 Axl-positive. "C" è il controllo, gruppo di topi non trattati. Le curve di crescita sono messe in grafico come volume del tumore medio $\pm$ s.e.m.

Breve descrizione dell'elenco di sequenze

SEQ ID NO: 1 evidenzia la sequenza dell'estremità 5' dell'aptamero, GL21 52-85 (vedere anche Fig. 1),

5' AUGAUCAAUCGCCUCAAUUCGACAGGAGGCUCAC 3'.

SEQ ID NO: 2 evidenzia la sequenza dell'estremità 5' dell'aptamero non funzionale non correlato utilizzato come controllo negativo in Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4-6:

5' UUCGUACCGGGUAGGUUGGCUUGCACAUAGAACGUGUCA 3'

SEQ ID NO: 3 evidenzia la sequenza di un breve RNA a forcina ad alta prestazione (shRNA) che ha come bersaglio specificatamente Axl (oligo ID V2HS_201787)

TGCTGTTGACAGTGAGCGCGCTCCAAGATTCTAGATGATTTAGTGAAGCCACA
GATGTAAATCATCTAGAATCTTGGAGCATGCCTACTGCCTCGGA

5

Descrizione dettagliata dell'invenzione

MATERIALI E METODI

Aptamero GL21 52-85

10 GL21 52-85 è un aptamero a RNA con 2'-fluoropirimidina (2'F-Py) resistente alla nucleasi costituito da 34 nucleotidi: 5' AUGAUCAAUCGCCUCAAUUCGACAGGAGGCUCAC 3'.

GL21 52-85 e una sequenza non correlata usata come controllo negativo sono stati acquistati da Sigma (Sigma, St. Louis, MO).

15

Linee cellulari e Transfezione

Cellule da glioma umano U87MG, cellule di seno umane SKBr3, MCF7, MDA-MB-231 e carcinoma epidermoide A431 (tutti da American Type Culture Collection, Manassas, VA), sono state cresciute in mezzo di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM) supplementato
20 con 10% siero di feto di bovino (FBS) e 2 mM di L-glutammina (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Il silenziamento del gene Axl in cellule di glioma U87MG è stato stabilito mediante transfezione di un breve RNA a forcina ad elevata prestazione (shRNA) che ha specificatamente come bersaglio Axl (da Expression ArrestTM Human shRNA Collection,
25 Open Biosystems, Huntsville, AL). I controlli sono stati effettuati usando un shRNA non correlato (shRNActrl) che non porta alla specifica degradazione di mRNA di Axl, Open Biosystem (Numero di cat. RHS1707). L'espressione di Axl in cellule di seno umane SKBr3 è stata ottenuta mediante transfezione di Axl TruClone (Origene, Rockville, MD).

Le cellule (3.5×10^5 cellule per piastra da 6 cm) sono state fatte crescere e ricoperte con le
30 miscele di transfezione contenenti il shRNA contro Axl o Axl TruClone (6 µg) e Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) in mezzo con siero ridotto Opti-MEM I (Invitrogen). Dopo 5 ore di incubazione, il mezzo di coltura completo è stato aggiunto alle cellule e l'incubazione è stata prolungata fino a 72 ore. Per i saggi di legame le cellule transfettate sono state piastrate in piastre a 24 pozzetti dopo 24 ore dalla transfezione.

Saggi di legame

Gli esperimenti di legame sono stati realizzati con RNA 5'-[³²P]-marcato. Per la marcatura gli RNA 2'-F-Py sono stati defosforilati all'estremità 5' utilizzando fosfatasi alcalina di batteri (Invitrogen, Carlsbad, CA) prima della marcatura dell'estremità 5' con [³²P] utilizzando T4 chinasi (Invitrogen) e γ-[³²P]-ATP (6x10³ Ci/mmol, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Svezia) secondo le istruzioni del fornitore.

Per gli esperimenti di legame su cellule, 3.5x10⁴ cellule sono state piastrate in piastre a 24 pozzetti in triplice copia e sono state incubate con l'aptamero GL21 52-85 o la sequenza non correlata utilizzata come controllo negativo ad una concentrazione 50nM in 200 µl di DMEM privo di siero per 20 min a temperatura ambiente in presenza di 100 µg/ml poliiinosina come competitore non specifico (Sigma, St. Louis, MO). Dopo cinque lavaggi con 500 µl DMEM, le sequenze di legame sono state recuperate in 300 µl di SDS 1%, e la quantità di radioattività registrata è stata contata.

La capacità degli aptameri di legarsi al dominio extracellulare solubile di Axl, Dtk e Mer è stata studiata mediante legame al filtro mettendo in grafico la frazione di RNA legata al filtro di nitrocellulosa in funzione della concentrazione di proteina, utilizzando la seguente equazione:

$$RNA\ legato = \frac{B\ max\ [Proteina]}{Kd + [Proteina]}$$

in cui Bmax è la quantità massima estrapolata di RNA:complesso proteina che sarà legato. 1nM di aptameri radiomarcanti (GL21 52-85 o non correlato) sono stati incubati con 1, 3.2, 10, 32, 100, 320 e 1000nM di dominio extracellulare solubile di Axl, Dtk, Mer (tutti da R&D Systems, Minneapolis, MN) per 15 min a 37° in salina con tampone fosfato (PBS) supplementata con 0,01% di albumina di siero bovino.

Dopo incubazione, la miscela aptamero-proteina è stata passata attraverso un filtro a membrana di nitrocellulosa (Millipore Co., Bedford, MA) ed il filtro è stato contato.

In tutti i saggi di legame i valori di fondo ottenuti con l'aptamero di RNA non correlato sono stati sottratti ai valori ottenuti con l'aptamero specifico GL21 52-85.

Analisi Immunoblot

Per valutare gli effetti degli aptameri sull'attività di Axl, cellule U87MG (1,5 x10⁵ cellule per piastra da 3,5 cm) sono state private di siero per tutta la notte, pretrattate con 200nM di

aptamero GL21 52-85 o aptamero non correlato utilizzato come controllo negativo per 3 ore e poi stimulate per 30 min con 400ng/ml di Gas6 (R&D Systems, Minneapolis, MN) da solo o in presenza di ogni aptamero. Gli aptameri sono stati sottoposti ad una breve fase di denaturazione-rinaturazione (85°C per 5 min, raffreddamento rapido su ghiaccio per 2 min, e lasciati riscaldare fino a 37°C) prima di ogni trattamento.

Per preparare gli estratti cellulari, le cellule sono state lavate due volte in PBS raffreddato con ghiaccio, e i lisati in tampone A (50 mM di tampone Tris-HCl pH 8,0 contenenti 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mg/ml aprotinina, 1 mg/ml pepstatina, 2 mg/ml leupeptina, 1 mM Na_3VO_4). La concentrazione di proteina è stata determinata mediante saggio di Bradford utilizzando albumina di siero bovino come standard. I lisati cellulari sono stati sottoposti a SDS-PAGE. I gel sono stati sottoposti ad electroblotting in membrane di polivinilidene difluoruro (Millipore Co., Bedford, MA), e i filtri sono stati saggiati con gli anticorpi primari indicati: anti-Axl e anti-fosfo-Axl (R&D Systems), anti-ERK1 (C-16) (Santa Cruz Biotechnology, California, Stati Uniti), anti-fosfo-44/42 MAP chinasi (E10) (anche indicato come p-Erk), (Cell Signaling, Beverly, MA,); anti- α tubulina (DM 1A) (Sigma, St. Louis, MO).

Le proteine sono state visualizzate con anticorpi secondari coniugati alla perossidasi utilizzando il sistema di chemiluminescenza potenziato (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Svezia). Dove indicato, i filtri sono stati strappati in 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 con 100 mM 2-mercaptoetanolo e 2% SDS per 30 min a 54°C, e saggiati nuovamente.

Saggio di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata con saggio CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation (Promega, Madison, WI) secondo le istruzioni del fornitore. Le cellule (4×10^3 cellule/pozzetto) sono state piastrate in piastre a 96 pozzetti in triplice copia e sono state trattate per 24 ore con GL21 52-85 denaturato al calore o con l'aptamero non correlato ad una concentrazione 3 μM . Sono state determinate le concentrazioni di RNA per assicurare la presenza continua di una concentrazione di almeno 200 nM, che prende in considerazione la semivita di 6 ore dell'aptamero in 10% di siero. La densità ottica (OD) è stata misurata utilizzando un contatore Multilabel (Bio-Rad) ad una lunghezza d'onda di 490 nm e la vitalità cellulare è stata calcolata mediante la seguente formula: Vitalità cellulare (%) = (OD cellule trattate / OD cellule controllo) $\times$ 100%.

Saggio di migrazione transwell

Cellule A549 sono state pretrattate con 200 nM di aptamero GL21 52-85 o aptamero non correlato e dopo 3 ore trattate con tripsina, risospese in DMEM privo di siero e contate. Le cellule (100000 in 100 μ l mezzo privo di siero per pozzetto) sono state poi piastrate in un camera superiore di un transwell a 24 pozzetti (Corning). Le cellule sono state esposte alla presenza di Gas6 (400 ng/ml) come induttore di migrazione in mezzo privo di siero (0,6 ml) nella camera inferiore. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore in 5% di CO₂ umidificata, le cellule sono state visualizzate mediante colorazione con cristal-violetto.

10 Esperimenti in vivo

Topi nudi atimici (nu/nu) sono stati mantenuti in un ambiente sterile secondo le linee guida pubblicate dal Dipartimento di Agricoltura degli Stati Uniti e dall'Associazione Americana per l'Accreditamento di Cura dell'Animale da Laboratorio (AAALAC).

I topi sono stati inoculati sia con 3×10^6 (in 100 μ l) cellule MDA-MB-231 propagate *in vitro* iniettate sottocute in ogni fianco. Circa 24 tumori non necrotici per ogni tipo di tumore, di circa 1 cm di diametro, sono stati divisi a caso in tre gruppi di otto topi per gruppo di trattamento come segue: gruppo 1, nessun trattamento; gruppo 2, trattati con RNA non correlato come controllo negativo (200 pmol/iniezione); gruppo 3, trattati con GL21 52-85 (200 pmol/iniezione). I composti sono stati iniettati intratumoralmente in volumi di 100 μ l, tre volte alla settimana per due settimane. Il giorno 0 indica il primo giorno di iniezione. Gli aptameri possono anche essere somministrati per via sistemica, in particolare se ottimizzati mediante aggiunta di glicole polietilenico (PEG).

Le iniezioni di volume sono abbastanza piccole per evitare che i composti siano forzati all'interno delle cellule a causa di una iniezione ad elevata pressione non specifica. I tumori sono stati misurati ogni 3 giorni con calibri tridimensionali. La seguente formula è stata utilizzata per calcolare il volume del tumore: $V_T = (W \times L \times H) \times 0.5236$ (W, la dimensione più corta; L, la dimensione più lunga, H, la dimensione intermedia). Le curve di crescita sono messe in grafico come volume del tumore medio $\pm$ s.e.m. L'analisi statistica dei dati di dimensione dei tumori è stata effettuata utilizzando una ANOVA ad una via. Un valore di *P* di 0,05 o inferiore è stato considerato indicativo di una differenza statisticamente significativa.

RISULTATI

GL21 52-85 è un RNA-Aptamero che interagisce con Axl RTK

GL21 52-85 è un RNA-aptamero 2'-fluoropirimidina (2'F-Py) resistente alla nucleasi costituito da 34 nucleotidi (Figura 1). È stato ottenuto riducendo la lunghezza dell'aptamero GL21 (92 mer) che gli autori hanno precedentemente generato mediante un
 5 approccio cell-SELEX differenziale su cellule tumorigeniche di glioblastoma U87MG. La strategia di selezione adottata è stata pubblicata ed è divulgata nella Domanda di Brevetto Internazionale WO 2010/023327.

L'aptamero GL21 52-85 si lega a cellule U87MG bersaglio con una K_d di 90 nM.

Gli autori hanno identificato il recettore Axl come bersaglio dell'aptamero GL21 52-85.

10 Quindi, la capacità dell'aptamero GL21 52-85 di legarsi alle cellule U87MG è significativamente ridotta alla diminuita espressione di Axl mediante uno specifico shRNA (Figura 2A). Viceversa, l'aptamero GL21 52-85 si lega a cellule di seno SKBr3 transfettate con Axl umano mentre non mostra alcun legame su cellule SKBr3 parentali che non esprimono il recettore Axl (Figura 2B).

15 Di conseguenza, le analisi di legame con l'aptamero GL21 52-85 su differenti linee cellulari di cancro, che mostrano una differente espressione di Axl, mostrano una correlazione tra il legame dell'aptamero e l'espressione di Axl (Figura 3). Quindi, tra le cellule testate l'aptamero GL21 52-85 si lega a cellule U87MG di glioma umano, a cellule MDA-MB-231 di seno e a cellule A431 di carcinoma epidermoide positive a Axl, mentre
 20 non si lega a cellule MCF7 e SKBr3 di seno che non esprimono il recettore.

L'aptamero GL21 52-85 riconosce specificatamente il recettore Axl espresso sulle superfici di cellule di cancro così come il dominio extracellulare solubile purificato del recettore (Figura 4). Quindi, un'analisi di legame su filtro realizzata con il dominio extracellulare solubile di Axl (indicato con EC-Axl) ha

25 confermato una forte affinità di GL21 52-85 per EC-Axl (K_d di 13 nM) mentre una affinità inferiore (k_d di 47 nM) è stata ottenuta per il dominio extracellulare di Dtk (indicato con EC-Dtk). Per quanto riguarda il legame al dominio extracellulare di Mer (EC-Mer), in base alla concentrazione di proteina utilizzata, non poteva essere calcolato alcun valore di K_d , ciò indicando che l'aptamero non si lega a EC-Mer o si lega alla
 30 proteina ma con una affinità di una grandezza 10^3 inferiore.

Per confronto, R428 mostra un EC_{50}/IC_{50} di 14 nmol/L nel saggio biochimico con chinasi *in vitro* usando proteina Axl ricombinante (Holland et al., 2010). Il valore K_d di mAb Axl YW327.6S2 rispetto a Axl umano è di circa 1 nM (Ye et al, 2010). SKI-606 e NA80x

inibiscono l'attività chinasi di AXL con un IC₅₀ di $0,56 \pm 0,08$ micromol/L e $12,67 \pm 0,45$ micromol/L, rispettivamente (Zhang et al, 2008 e WO2009127417).

GL21 52-85 inibisce l'attività Axl

5 L'identificazione di un aptamero che si lega al recettore Axl fa sorgere l'ovvia questione se questo aptamero possa interferire con l'attività del recettore.

Quindi, gli autori hanno analizzato se GL21 52-85 potrebbe inibire la fosforilazione di Axl sia in condizione basale (Figura 5A) che a seguito della stimolazione con Gas6 di cellule U87MG positive a Axl (Figura 5B). Come mostrato in Figura 5A, l'aptamero GL21 52-85,
10 ad una concentrazione di 200Nm, inibisce fortemente la fosforilazione di Axl e dell'effettore a valle ERK. Inoltre, riduce drasticamente la fosforilazione dipendente da Gas6 di Axl e ERK (Figura 5B).

Come fase successiva, gli autori hanno investigato l'effetto di GL21 52-85 sulla crescita cellulare di cellule positive a Axl mediante saggio MTT. Cellule U87MG, MDA-MB-231
15 o A431 sono state trattate per 24 ore con l'aptamero GL21 52-85 o RNA non correlato come controllo negativo. L'aptamero GL21 52-85 riduce la vitalità cellulare di tutte le linee cellulari rispetto a cellule non trattate o trattate con l'RNA di controllo (Figura 5C). Gli autori hanno inoltre esaminato gli effetti dell'aptamero GL21 52-85 sulla migrazione di cellule A549, e hanno trovato che le cellule trattate con l'aptamero GL21 52-85 hanno una
20 diminuita capacità di motilità rispetto a cellule trattate con la sequenza non correlata nella migrazione nella camera di Boyden (Figura 5D).

GL21 52-85 sopprime la crescita tumorale in vivo

È stato riportato che l'inibizione di Axl attenua significativamente la crescita tumorale (Li
25 et al., 2009; Ye et al., 2010; Holland et al., 2010). Quindi gli autori hanno considerato se l'aptamero GL21 52-85 potesse essere efficace sulla crescita tumorale xenograft.

Per questo scopo, topi nudi sono stati inoculati con la linea di tumore al seno umano MDA-MB-231 che esprime elevati livelli di Axl e i tumori sono stati lasciati crescere fino a che hanno raggiunto circa 1 cm di diametro nella dimensione più lunga. I tumori sono stati poi
30 iniettati (Giorno 0) con 100 μ l (200 pmoli concentrazione finale) di aptamero GL21 52-85 o di RNA non correlato utilizzato come controllo negativo. Le iniezioni sono state somministrate tre volte alla settimana per le successive due settimane. I tumori sono stati misurati ogni 3 giorni. Come mostrato in Figura 6, una marcata riduzione nel volume

tumorale è osservata in presenza dell'aptamero GL21 52-85. Quindi, dal giorno 9 al giorno 15 i tumori trattati con GL21 52-85 arrestavano la loro crescita e mostravano una riduzione del volume. La soppressione del volume tumorale era specifica del gruppo trattato con GL21 52-85 e non si è osservata con RNA non correlato.

5

DISCUSSIONE

Il recettore tirosina chinasi Axl è espresso in vari tipi di cancro ed è coinvolto in molteplici processi tumorigenici, ivi incluso il favorire la crescita delle cellule tumorali, la migrazione, l'invasione, la metastasi così come l'angiogenesi, portando ad un interessante bersaglio nelle strategie terapeutiche.

10

Nella presente invenzione, gli autori hanno identificato un aptamero RNA sintetico resistente alla nucleasi chiamato GL21 52-85, rivolto al dominio extracellulare del recettore umano di Axl.

15

Gli autori hanno dimostrato che l'aptamero GL21 52-85 riconosce specificatamente il recettore Axl espresso sulla superficie di cellule di cancro (cancro del polmone non a piccole cellule, cancro del seno, glioma) così come il dominio extracellulare solubile purificato del recettore. D'altro lato, non si lega a linee cellulari che non esprimono Axl.

20

Il trattamento di cellule di cancro positive a Axl con l'aptamero inibisce fortemente l'attivazione di Axl basale e mediata dal ligando, portando all'inattivazione del segnale a valle di Axl con una riduzione della fosforilazione di ERK. Inoltre, GL21 52-85 inibisce la proliferazione di cellule di cancro in vitro.

25

Studi precedenti hanno stabilito il ruolo di Axl nel favorire la crescita di cellule tumorali (Shieh et al., 2005; Sainaghi et al., 2005; Zhang et al., 2008; Koorstra et al., 2009; Hutterer et al., 2008; Li et al., 2009; Ye et al., 2010; Holland et al., 2010). Gli autori hanno testato l'efficacia antitumorale dell'aptamero GL21 52-85 in modello xenograft di cellule di cancro del seno MDA-MB-231 umano. In maniera notevole, come conseguenza dell'inibizione di Axl, l'aptamero GL21 52-85 è risultato in grado di inibire fortemente la crescita tumorale.

30

I dati della presente invenzione sono evidenze convincenti per lo sviluppo clinico dell'aptamero GL21 52-85 come inibitore innovativo di Axl sia a scopi terapeutici che diagnostici.

In conclusione, l'identificazione di un RNA-aptamero neutralizzante che colpisce specificatamente il recettore Axl apre vie allo sviluppo di strategie innovative per la diagnosi e la terapia del cancro.

5 Riferimenti bibliografici

- Cerchia L, de Franciscis V, Condorelli G. "Method for obtaining oligonucleotide aptamers and uses thereof", International patent application WO 2010/023327.
- Cerchia L, de Franciscis V (2010). Targeting cancer cells with nucleic acid aptamers. *Trends Biotechnol.*28(10):517-525.
- 10 Cerchia L, Esposito CL, Jacobs AH, Tavitian B, de Franciscis V (2009). Differential SELEX in human glioma cell lines. *PLoS One* 4 (11): e7971.
- Cerchia L, Hamm J, Libri D, Tavitian B, de Franciscis V (2002) Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Letters* 538: 12-16.
- Chung BI, Malkowicz SB, Nguyen TB, Libertino JA, McGarvey TW (2003). Expression
15 of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma. *DNA Cell Biol* 22: 533–540.
- Ellington AD, Szostak JW (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 46: 818-822.
- Graham DK, Sarher SL. "Axl tyrosine kinase inhibitors and methods of making and using the same", International patent application WO2008098139.
- 20 Hafizi S, Dahlbäck B (2006). Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17(4):295-304.
- Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y et al. (2010). R428, a Selective Small Molecule Inhibitor of Axl Kinase, Blocks Tumor Spread and Prolongs Survival in Models of Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res* 70(4): 1544-1554.
- 25 Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M et al. (2008). Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14: 130–138.
- Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M et al. (1991). A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 6: 2113-2120.
- 30 Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S et al. (2009). The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 8: 618–626.

- Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA et al. (2009). Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene* 28: 3442–3455.
- Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK (2008). TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 100:35-83.
- 5 Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H et al. (2002). Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* 8: 361–367.
- O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A et al. (1991). Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine
- 10 kinase. *Mol Cell Biol* 11: 5016-5031.
- Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M et al. (2005). Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol* 204: 36–44.
- Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG et al. (2005). Expression of axl in lung
- 15 adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia* 7: 1058–1064.
- Tuek C, Gold L (1990). Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment RNA Ligands to Bacteriophage T4 Polymerase. *Science* 249: 505-510.
- Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH et al. (2006). Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and
- 20 invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5799–804.
- Wu CW, Li AF, Chi CW, Lai CH et al. (2002). Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res* 22: 1071–1078
- Ye X, Li Y, Stawicki S, Couto S et al. (2010). An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene*
- 25 July 5.
- Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K et al. (2008). AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res* 68: 1905–1915.

RIVENDICAZIONI

1. Un aptamero nucleotide avente essenzialmente la sequenza: 5'-AUGAUCAAUCGCCUCAAUUCGACAGGAGGCUCAC-3' per uso nel trattamento e/o
5 prevenzione o per la diagnosi di un disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl.
2. L'aptamero nucleotide secondo la rivendicazione 1, essendo resistente alla nucleasi.
3. L'aptamero nucleotide secondo la rivendicazione 2, in cui i residui di pirimidina sono modificati in 2'-fluoropirimidina.
4. L'aptamero nucleotide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui il
10 disordine indotto da recettore tirosina chinasi Axl è causato da, associato a e/o accompagnato da iperfunzione della chinasi Axl.
5. L'aptamero nucleotide secondo la rivendicazione 4, in cui il disordine indotto da recettore tirosina chinasi Axl è selezionato tra i disordini iperproliferativi.
6. L'aptamero nucleotide secondo la rivendicazione 5, in cui il disordine
15 iperproliferativo indotto dal recettore tirosina chinasi Axl è selezionato dal gruppo costituito da cancro o metastasi tumorale primaria.
7. L'aptamero nucleotide secondo la rivendicazione 6, in cui il cancro o metastasi tumorale primaria è selezionato dal gruppo di: cancro del seno, cancro del colon, cancro della prostata, cancro del polmone, cancro gastrico, cancro ovarico, cancro all'endometrio,
20 cancro renale, cancro epatocellulare, cancro della tiroide, cancro uterino, carcinoma esofageo, carcinoma a cellule squamose, leucemia, osteosarcoma, melanoma, glioblastoma, neuroblastoma, o metastasi tumorale primaria.
8. Una composizione farmaceutica comprendente l'aptamero nucleotide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, da utilizzare come trattamento e/o prevenzione di un
25 disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl.
9. La composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 8 ulteriormente comprendente un altro agente terapeutico.
10. Un metodo per la diagnosi di un disordine indotto da recettore tirosina chinasi Axl in un paziente da cui è stato ottenuto un campione comprendente:
30 - incubazione del campione con l'aptamero nucleotide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7;
- misurazione del legame dell'aptamero nucleotide con il campione.

11. Il metodo secondo la rivendicazione 10 in cui il campione è un campione di sangue, siero o saliva, una biopsia, urina o fluido cerebrospinale.

12. Un kit per la diagnosi di un disordine indotto dal recettore tirosina chinasi Axl in un paziente da cui è stato ottenuto un campione comprendente un aptamero nucleotide

5 secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7.

A

GL21 52-85 : AUGAUCAAUCGCCUCAAUUCGACAGGAGGCUCAC

B

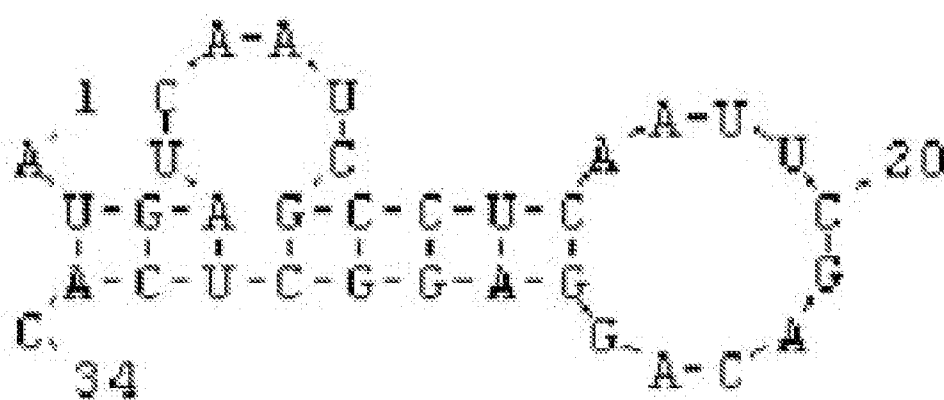
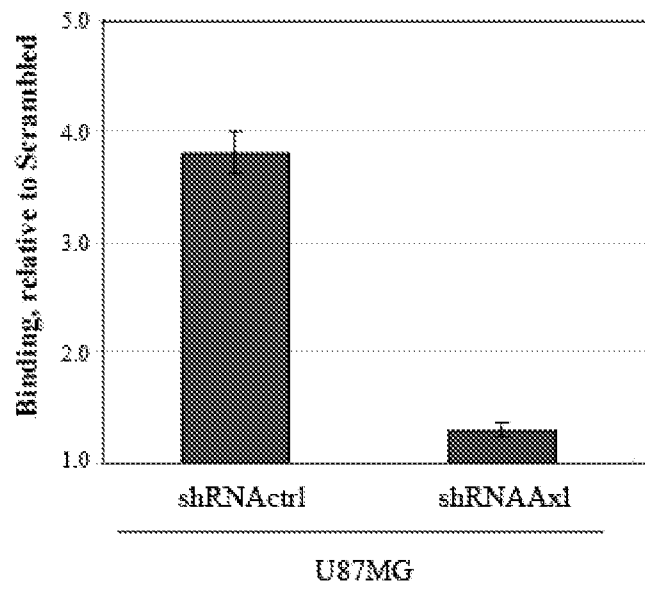
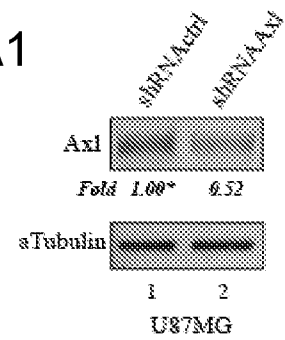
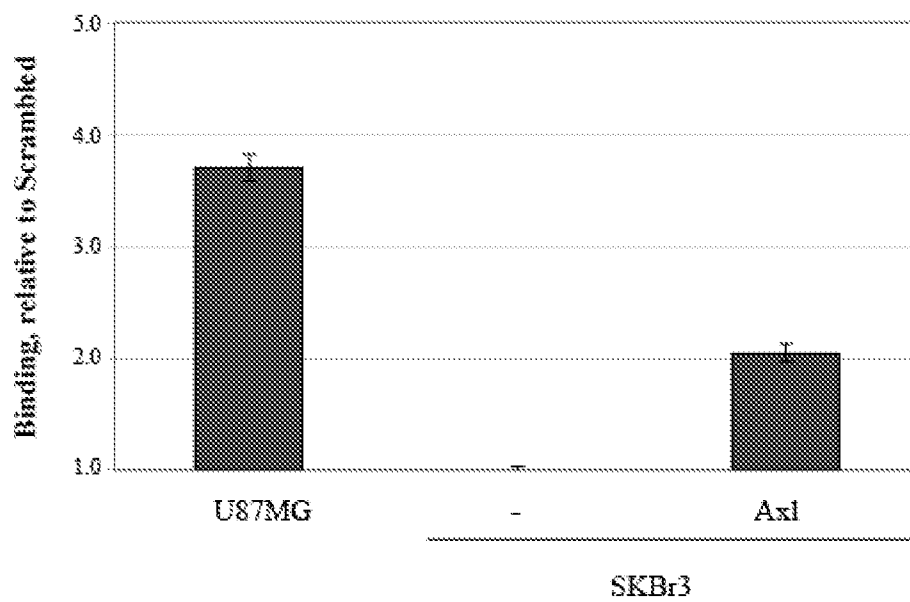
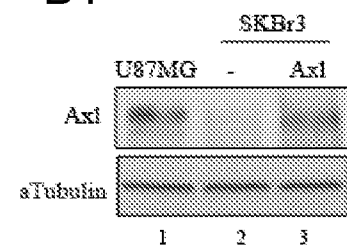
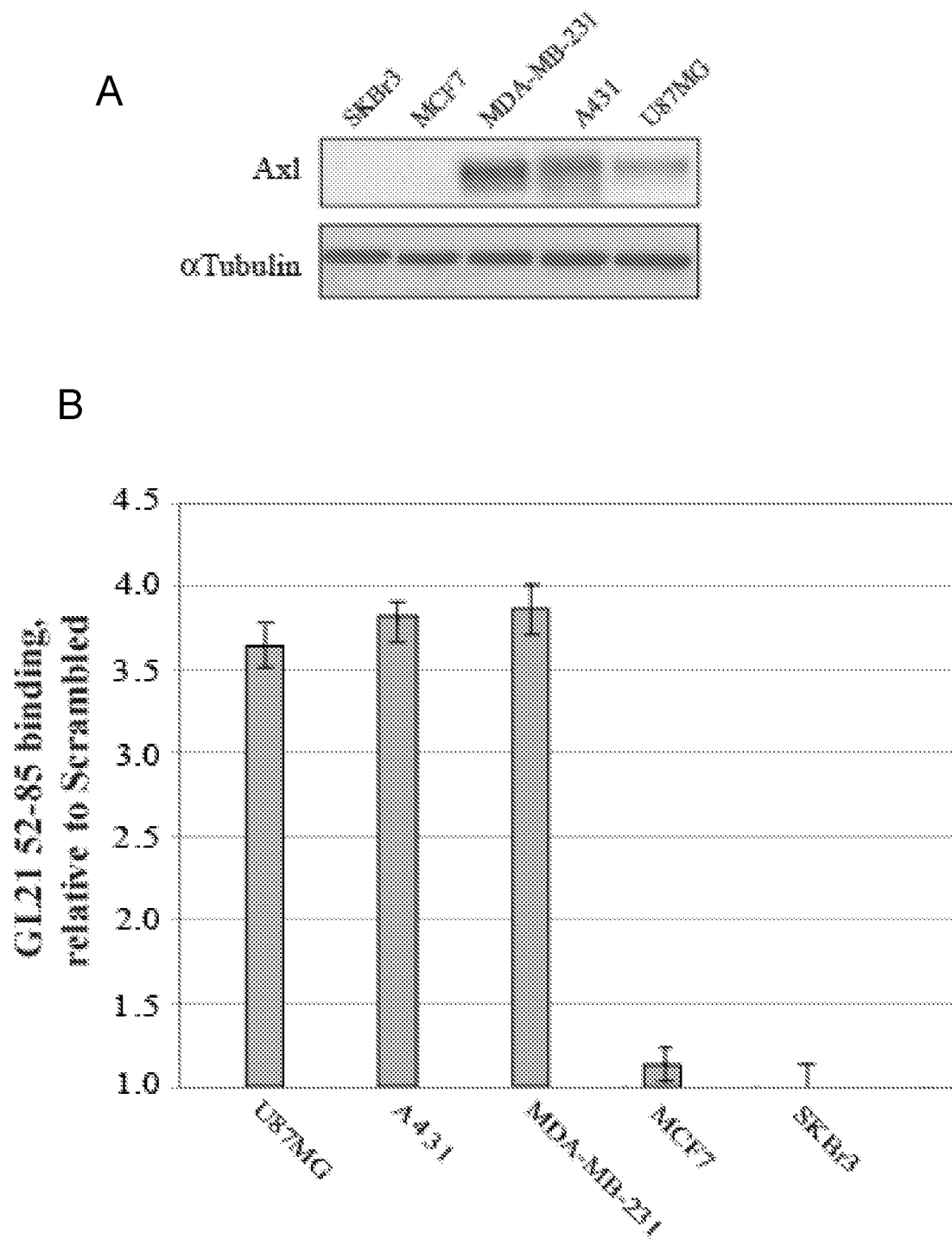


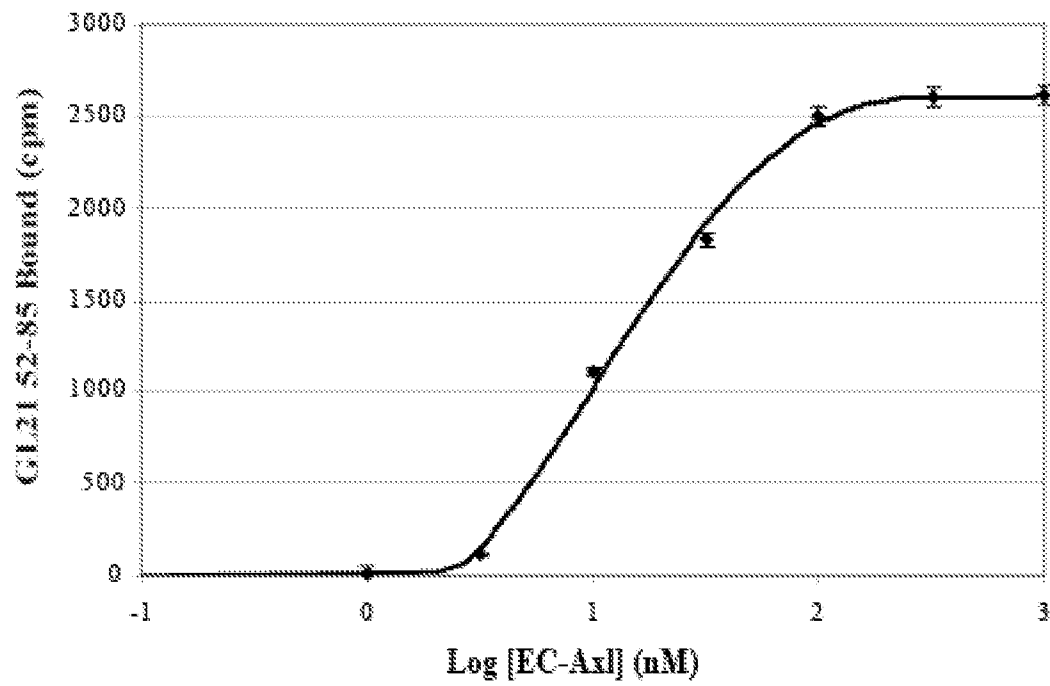
Figure 1

A**A1****B****B1****Figure 2**

**Figure 3**

4/6

A



B

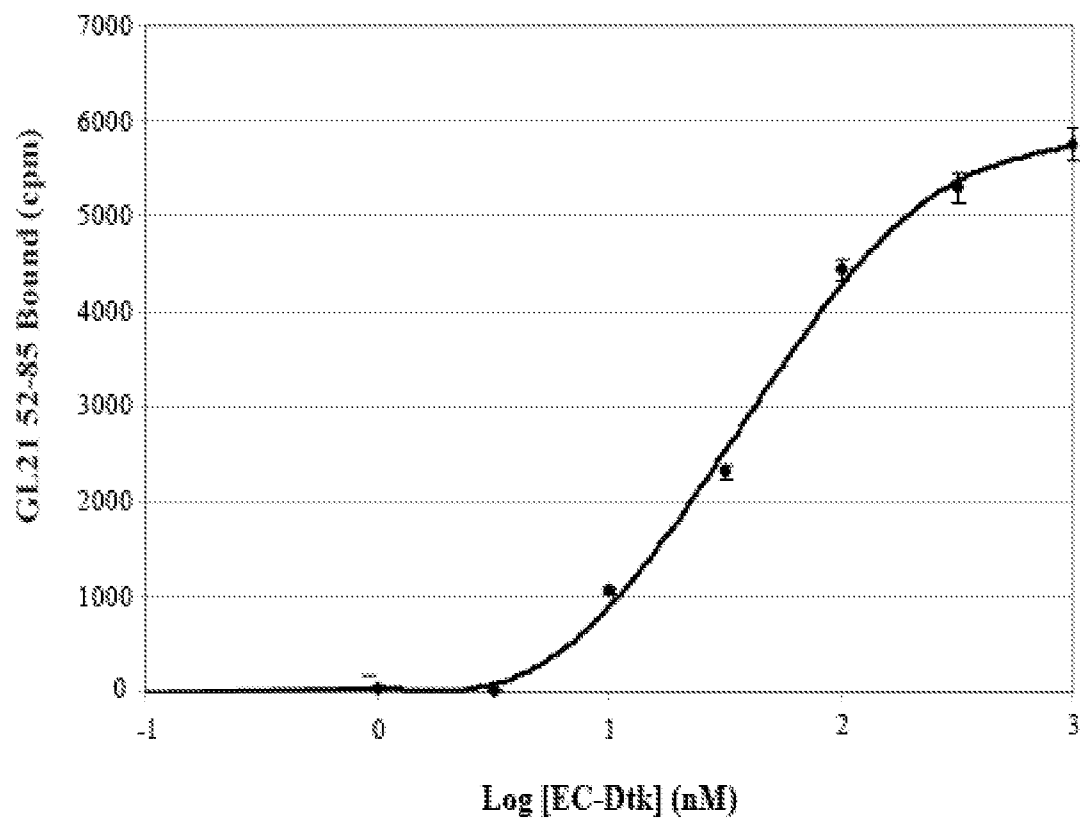
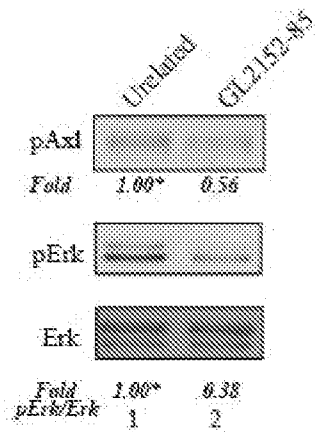
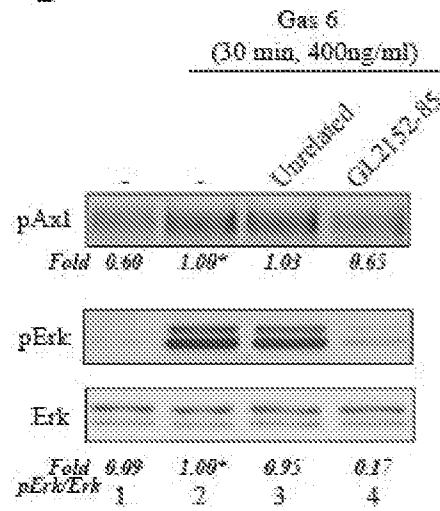


Figure 4

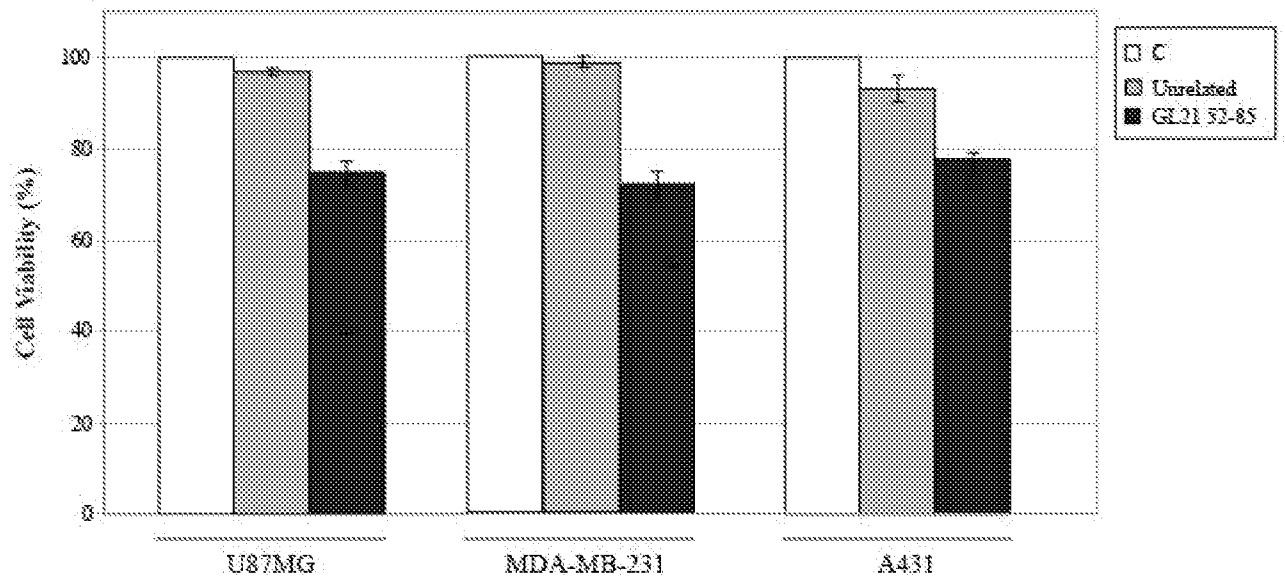
A



B



C



D

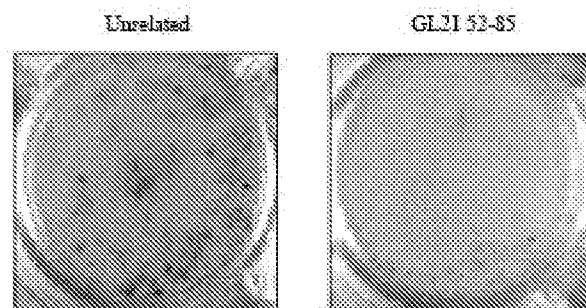


Figure 5

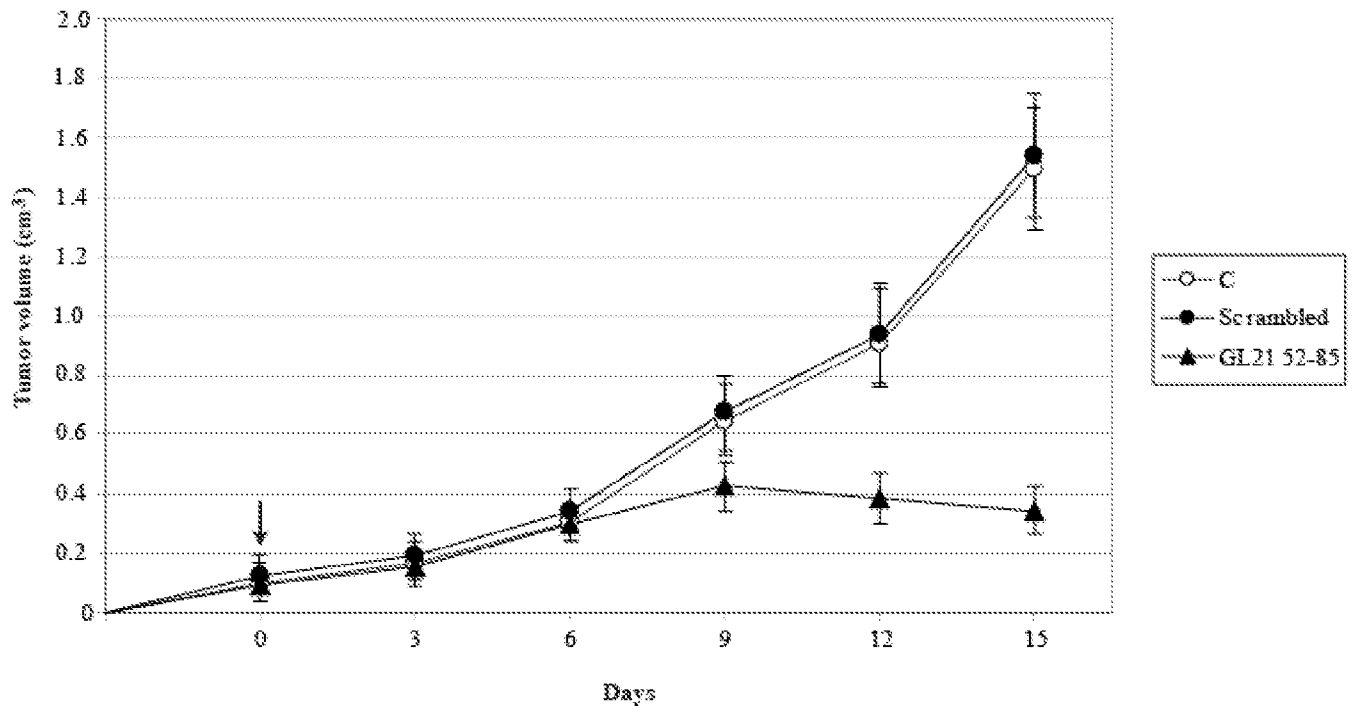


Figure 6