

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 323**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2013** **PCT/US2013/074786**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014** **WO14093690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013** **E 13862780 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras limitación: **05.04.2023** **EP 2931265**

54 Título: **Péptidos de AXL modificados y su uso en la inhibición de la señalización de AXL en terapia anti-metastásica**

30 Prioridad:

14.12.2012 US 201261737276 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente limitada:
15.06.2023

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (50.0%)
Office of the General Counsel, Bldg 170, Main
Quad, P.O. 20386
Stanford, CA 94305-2038, US y
ARAVIVE BIOLOGICS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 665 323 T7

DESCRIPCIÓN

Péptidos de AXL modificados y su uso en la inhibición de la señalización de AXL en terapia anti-metastásica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a invasión de tumor y metástasis, p.ej., tratamientos o diagnósticos de invasión de tumor o metástasis, a través de rutas relacionadas con AXL, MER y Tyro3 y/o GAS6.

10 **Antecedentes de la invención**

La invasión y la metástasis constituyen los aspectos del cáncer más insidiosos y mortales. Mientras que los tumores con una invasión mínima o ninguna en absoluto se pueden extirpar con éxito, una vez que el neoplasma se convierte en invasivo, puede diseminarse a través del sistema linfático y/o vascular hacia múltiples sitios y la extirpación completa se hace difícil. La invasión y la metástasis matan al huésped a través de dos procesos: invasión local y colonización y lesión de órgano distal. La invasión local puede comprometer la función de los tejidos implicados por compresión local, destrucción local o prevención de la función normal del órgano. El principal punto de inflexión en el cáncer, sin embargo, es el establecimiento de metástasis distante. Llegado este punto, es imposible curar al paciente mediante terapia local solamente.

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

La micro invasión local puede tener lugar pronto, incluso aunque pueda no ser evidente la diseminación distante o no haya empezado todavía. Las células tumorales penetran en la membrana del basamento epitelial y entran en el estroma intersticial subyacente durante la transición desde el carcinoma *in situ* al invasivo. Una vez que las células tumorales invaden el estroma subyacente, pueden acceder a los vasos linfáticos y sanguíneos para diseminación distante al mismo tiempo que liberan fragmentos de matriz y factores de crecimiento. Durante la transición de carcinoma benigno a invasivo, se producen cambios generales y generalizados en la organización, distribución y cantidad de la membrana del basamento epitelial.

Los esfuerzos terapéuticos en la prevención y el tratamiento del cáncer se han centrado al nivel de las rutas de señalización o las proteínas de modulación selectivas. Las actividades de la proteína quinasa, homeostasia del calcio y la activación de oncoproteína son señales de activación y por tanto pueden ser sitios reguladores clave para la intervención terapéutica. Las quinasas en las rutas de señalización de que regulan la invasión y angiogénesis pueden ser importantes reguladores de metástasis. Una de las clases de dianas moleculares bioquímicas más extensa es la familia de los receptores de tirosina quinasa (RTK). Las dianas moleculares de receptor de tirosina quinasa más comunes hasta la fecha son los receptores de EGF y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Entre las dianas moleculares de quinasa más nuevas se incluyen la familia RTK tipo III c-kit y abl. Se han administrado los inhibidores de estas moléculas en combinación con quimioterapia clásica.

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

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

El receptor de tirosina quinasa AXL (también conocido como Ufo y Tyro7) pertenece a la familia de los receptores de tirosina que incluye Tyro3 (Sky) y Mer (Tyro12). Un ligando común para la familia AXL es GAS6 (proteína 6 específica de detención del crecimiento). AXL humano es un marco de lectura abierto de 2.682-pb capaz de dirigir la síntesis de un polipéptido de 894 aminoácidos. Se han caracterizado dos variantes de ARNm, el transcrito variante 1 es accesible en el Genbank, NM_021913.3 y el transcrito variante 2 es accesible en M_001699.4. La secuencia de polipéptidos de la proteína nativa se proporciona como SEQ ID NO: 1 y se puede hacer referencia específicamente a la secuencia con respecto a las modificaciones de aminoácido. Las funciones celulares importantes de GAS6/AXL incluyen adhesión celular, migración, fagocitosis e inhibición de apoptosis. GAS6 y la familia de receptores AXL están altamente regulados en el tejido y de manera específica para la enfermedad.

AXL, MER y Tyro3 se caracterizan cada uno de ellos por una estructura molecular única, en el sentido de que la región intracelular tiene la estructura típica de un receptor de tirosina quinasa y el dominio extracelular contiene fibronectina III y motivos Ig similares a las moléculas de adhesión de tipo cadherina. Durante el desarrollo, se expresan AXL, MER y Tyro3 en varios órganos, incluyendo el cerebro, lo que indica que dicho RTK participa en el desarrollo mesenquimal y neurológico. En los adultos, la expresión de AXL, MER y Tyro3 es baja pero retorna a altos niveles de expresión en diversos tumores. GAS6 es hasta el momento el único ligando de activación para AXL, MER y Tyro3.

Los receptores de tirosina quinasa (RTK) son activados generalmente por ligandos que promueven la dimerización del receptor y, a su vez, la autofosforilación de restos de tirosina dentro del dominio citosólico. La unión de proteínas de señalización a estos restos de tirosina fosforilados conduce a su vez a la señalización en dirección 3'. La familia AXL, MER y Tyro3 de RTK es única en el sentido de que son activados por GAS6, miembros de la familia de proteína dependiente de vitamina K que se asemejan a los factores de coagulación de la sangre en lugar de a factores del crecimiento típicos.

Sumario de la invención

La presente invención se define con las reivindicaciones. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que las rutas relacionadas con AXL, MER y Tyro3 y/o GAS6 están relacionadas con la invasión de tumor y/o metástasis. Por consiguiente, la presente divulgación que comprende la invención proporciona composiciones y sus usos en métodos para el tratamiento de invasión de tumor y/o metástasis, p.ej., a través de la inhibición de las rutas relacionadas con AXL, MER y/o Tyro3 y/o GAS6. Por otra parte, la presente divulgación proporciona reactivos y métodos útiles para determinar la susceptibilidad o probabilidad de que un tumor se haga invasivo y/o metastásico, p.ej., a través de la detección de la actividad de AXL, MER, Tyro3 y/o GAS6.

En algunos casos, el agente útil para el tratamiento de invasión de tumor y/o metástasis, p.ej., a través de la inhibición de las rutas relacionadas AXL, MER y Tyro3 y/o GAS6 es un agente inhibidor. En algunos casos, el agente inhibidor se selecciona del grupo que consiste en (a) un inhibidor de la actividad de AXL, MER y/o Tyro3, (b) un inhibidor de la actividad de GAS6 y (c) un inhibidor de la interacción de AXL, MER y/o Tyro3-GAS6, en el que el agente inhibidor es capaz de unirse a GAS6 con mayor afinidad en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, el agente inhibidor se une a dos o más epítopos en una sola GAS6.

En algunos casos, al menos uno de los epítopos es el sitio de unión de AXL, MER o Tyro3 mayor o menor en GAS6.

En algunos casos, el agente inhibidor puede unirse a un sitio de unión de AXL, MER o Tyro3s mayor y menor en una sola GAS6.

En algunos casos, el agente inhibidor puede unirse a un sitio de unión de AXL, MER o Tyro3 mayor de GAS6 y uno o más epítopos de GAS6 adicionales en una sola GAS6.

En algunos casos, el agente inhibidor puede unirse al sitio de unión de AXL, MER o Tyro3 menor en una GAS6 y uno o más epítopos adicionales en una sola GAS6.

En algunos casos, el agente inhibidor puede unirse a dos o más epítopos en una sola GAS6.

En algunos casos, el agente inhibidor es capaz de antagonizar la interacción de unión GAS6/receptor mayor y/o menor, en la que el receptor se selecciona entre AXL, MER y Tyro3.

En algunos casos, el agente inhibidor es capaz de antagonizar la interacción de unión GAS6/receptor mayor, en la que el receptor se selecciona entre AXL, MER y Tyro3.

En algunos casos, el agente inhibidor es capaz de antagonizar la Interacción de unión GAS6/receptor menor, en la que el receptor se selecciona entre AXL, MER y Tyro3.

En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido, una fusión polipéptido-vehículo, una fusión polipéptido-Fc, un conjugado de polipéptido, un conjugado polipéptido-fármaco, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un conjugado anticuerpo fármaco, un fragmento de anticuerpo, una estructura relacionada con anticuerpo o una combinación de los mismos.

En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido natural o sintético.

En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido no-anticuerpo.

En algunos casos, el agente inhibidor de la presente invención puede incluir, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, darpina, avimero, adnectina, anticalina, Affibody, Maxibody, u otro andamio estructural de proteína, o una combinación de los mismos.

5 En algunos casos, el agente inhibidor es un conjugado de polipéptido o un conjugado de anticuerpo.

En algunos casos, el agente inhibidor es un conjugado polipéptido-polímero, en el que el polímero se selecciona entre PEG, polímeros que contienen PEG, polímeros degradables, polímeros biocompatibles, hidrogeles y otras estructuras de polímero o una combinación de los mismos.

10 En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido, en el que dicho polipéptido comprende un polipéptido variante de AXL soluble en el que dicho polipéptido variante de AXL carece del dominio de membrana de AXL y tiene al menos una mutación en relación con el tipo silvestre que aumenta la afinidad del polipéptido de AXL uniéndose a GAS6.

15 En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido, en el que dicho polipéptido comprende un polipéptido variante de MER soluble en el que dicho polipéptido variante del MER carece del dominio de membrana de MER y tiene al menos una mutación en relación con el tipo silvestre que aumenta afinidad del polipéptido de MER uniéndose a GAS6.

20 En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido, en el que dicho polipéptido comprende un polipéptido variante de Tyro3 soluble, en el que dicho polipéptido variante de Tyro3 carece del dominio de membrana de Tyro3 y tiene al menos una mutación en relación con el tipo silvestre que aumenta la afinidad del polipéptido de Tyro3 uniéndose a GAS6.

25 En algunos casos, el inhibidor es un polipéptido variante de del AXL, MER o Tyro3 que inhibe la unión entre un polipéptido AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre y una proteína GAS6 *in vivo* o *in vitro*.

30 En algunos casos, el polipéptido carece de un dominio fibronectina funcional (FN) y/o presenta una mayor afinidad del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

35 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece del dominio de membrana, tiene más de un dominio Ig1 y presenta una mayor afinidad del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 tiene dos dominios Ig1. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene tres dominios Ig1.

40 En algunos casos, el polipéptido de AXL, MER o Tyro3 carece del dominio de membrana, tiene más de un dominio Ig2 y presenta una mayor afinidad del polipéptido de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

45 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 tiene dos dominios Ig2.

En algunos casos, el polipéptido es un polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble, en el que dicho polipéptido variante de AXL soluble carece del dominio de membrana de AXL, MER o Tyro3, tiene más de un dominio Ig1, más de un dominio Ig2 y presenta una mayor afinidad del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

50 En algunos casos, el polipéptido es un polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble, en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble carece del dominio de membrana de AXL, MER o Tyro3, carece de un dominio de fibronectina funcional (FN), tiene más de un dominio Ig1, más de un dominio Ig2, y en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

55 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble tiene dos dominios Ig1 y dos dominios Ig2.

60 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble tiene los dominios inmunoglobulina conectados directamente.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble tiene los dominios de inmunoglobulina conectados indirectamente.

65 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble carece del dominio de membrana de AXL, MER o Tyro3, es capaz de unirse tanto al sitio de unión mayor como menor de una sola GAS6 y en el que

dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 del tipo silvestre.

En algunos casos, el polipéptido tiene un dominio Ig1 y carece de un dominio Ig2 funcional.

En algunos casos, el polipéptido es un polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble, en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble carece del dominio de transmembrana de AXL, MER o Tyro3, tiene un dominio Ig1, carece de un dominio Ig2 funcional y en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 tipo silvestre.

En algunos casos, el polipéptido es un polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble, en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble carece del dominio de transmembrana de AXL, MER o Tyro3, carece de un dominio de fibronectina funcional (FN), tiene un dominio Ig1, carece de un dominio Ig2 funcional y en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 comprende además un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador comprende una o más unidades (GLY)₄SER.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece del dominio intracelular AXL, MER o Tyro3.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece de un dominio de fibronectina funcional (FN) y en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 comprende al menos una modificación de aminoácido en relación con la secuencia de AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende al menos una modificación de aminoácido dentro de una región seleccionada del grupo que consiste en 1) entre 15-50, 2) entre 60-120, y 3) entre 125-135 de la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO:1).

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende al menos una modificación de aminoácido en la posición 19, 23, 26, 27, 32, 33, 38, 44, 61, 65, 72, 74, 78, 79, 86, 87, 88, 90, 92, 97, 98, 105, 109, 112, 113, 116, 118 o 127 de la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de las mismas.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 1) A19T, 2) T23M, 3) E26G, 4) E27G o E27K 5) G32S, 6) N33S, 7) T38I, 8) T44A, 9) H61Y, 10) D65N, 11) A72V, 12) S74N, 13) Q78E, 14) V79M, 15) Q86R, 16) D87G, 17) D88N, 18) I90M o I90V, 19) V92A, V92G o V92D, 20) I97R, 21) T98A o T98P, 22) T105M, 23) Q109R, 24) V112A, 25) F113L, 26) H116R, 27) T118A, 28) G127R o G127E, y 29) G129E y una combinación de los mismos.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) valina 92; y (d) glicina 127.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) ácido aspártico 87 y (b) valina 92.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) valina 92; (d) glicina 127 y (e) alanina 72.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en la siguiente posición: alanina 72.

En algunos casos, en el polipéptido variante de AXL soluble el resto glicina 32 está reemplazado con un resto serina, el resto ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, el resto valina 92 está reemplazado con un resto alanina o el resto glicina 127 está reemplazado con un resto arginina o una combinación de los mismos.

En algunos casos, en el polipéptido variante de AXL soluble, el resto ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina o el resto valina 92 está reemplazado con un resto alanina o una combinación de los mismos.

5 En algunos casos, en el polipéptido variante de AXL soluble, el resto alanina 72 está reemplazado con un resto valina.

10 En algunos casos, en el polipéptido variante de AXL soluble, el resto glicina 32 está reemplazado con un resto serina, el resto ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, el resto valina 92 está reemplazado con un resto alanina, el resto glicina 127 está reemplazado con un resto arginina o un resto alanina 72 está reemplazado con un resto valina o una combinación de los mismos.

15 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) ácido glutámico 26; (b) valina 79; (c) valina 92; y (d) glicina 127.

En algunos casos, en el polipéptido variante de AXL soluble, el resto ácido glutámico 26 está reemplazado con un resto glicina, el resto valina 79 está reemplazado con un resto metionina, el resto valina 92 está reemplazado con un resto alanina, o el resto glicina 127 está reemplazado con un resto arginina o una combinación de los mismos.

20 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende al menos una región de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en región de aminoácido 19-437, 130-437, 19-132, 21-121, 26-132, 26-121 y 1-437 del polipéptido AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), y en el que una o más modificaciones de aminoácidos tiene lugar en dicha región de aminoácido.

25 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) alanina 72; y valina 92.

30 En algunos casos, en el polipéptido variante de AXL soluble, glicina 32 está reemplazado con un resto serina, ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, alanina 72 está reemplazado con un resto valina, y valina 92 está reemplazado con un resto alanina, o una combinación de los mismos.

35 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc y en el que dicha variante de AXL comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) alanina 72; y (d) valina 92.

40 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc y en el que glicina 32 está reemplazado con un resto serina, ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, alanina 72 está reemplazado con un resto valina, y valina 92 está reemplazado con un resto alanina, o una combinación de los mismos.

45 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc y en el que dicha variante de AXL comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO:1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) alanina 72; (d) valina 92; y (e) glicina 127.

50 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc y en el que glicina 32 está reemplazado con un resto serina, ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, alanina 72 está reemplazado con un resto valina, valina 92 está reemplazado con un resto alanina y glicina 127 está reemplazado con un resto arginina o una combinación de los mismos.

55 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc, carece de dominio FN funcional y en el que dicha variante de AXL comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) alanina 72; y (d) valina 92.

60 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc, carece de un dominio FN funcional, y en que glicina 32 está reemplazado con un resto serina, ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, alanina 72 está reemplazado con un resto valina, y valina 92 está reemplazado con un resto alanina, o una combinación de los mismos.

65 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc, carece de un dominio FN funcional, y en el que dicha variante de AXL comprende cambios de aminoácidos en

relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) alanina 72; (d) valina 92; y (e) glicina 127.

5 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc, carece de un dominio FN funcional, y en el que glicina 32 está reemplazado con un resto serina, ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, alanina 72 está reemplazado con un resto valina, valina 92 está reemplazado con un resto alanina y glicina 127 está reemplazado con un resto de arginina o una combinación de los mismos.

10 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc, carece de un dominio FN funcional, carece de un dominio Ig2, y en el que dicha variante de AXL comprende cambios de aminoácidos en relación con la secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) alanina 72 y (d) valina 92.

15 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc, carece de un dominio FN funcional, carece de un dominio Ig2 y en el que glicina 32 está reemplazado con un resto serina, ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, alanina 72 está reemplazado con un resto valina y valina 92 está reemplazado con un resto alanina o una combinación de los mismos.

20 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc, carece de un dominio FN funcional, carece de un dominio Ig2, y en el que dicha variante de AXL comprende cambios de aminoácidos en relación con secuencia de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en las siguientes posiciones: (a) glicina 32; (b) ácido aspártico 87; (c) alanina 72; (d) valina 92; y (e) glicina 127.

25 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es una proteína de fusión que comprende un dominio Fc, carece de un dominio FN funcional, carece de un dominio Ig2 y en el que glicina 32 está reemplazado con un resto serina, ácido aspártico 87 está reemplazado con un resto glicina, alanina 72 está reemplazado con un resto valina, valina 92 está reemplazado con un resto alanina, y glicina 127 está reemplazado con un resto arginina o una combinación de los mismos.

30 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido variante de AXL soluble tiene una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M o 1×10^{-12} M para GAS6.

35 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble presenta una afinidad para GAS6 que es al menos aproximadamente 5 veces más fuerte, al menos aproximadamente 10 veces más fuerte o al menos aproximadamente 20 veces más fuerte que la afinidad del polipéptido AXL de tipo silvestre.

40 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble comprende una o más unidades (GLY)₄SER. En algunos casos, el enlazador comprende 1, 2, 3 o 5 unidades (GLY)₄SER.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble inhibe la unión entre el polipéptido del AXL, MER y/o Tyro3 tipo silvestre y una proteína GAS6 *in vivo* o *in vitro*.

45 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL soluble es un polipéptido de fusión que comprende un dominio Fc.

En algunos casos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s solubles.

50 En algunos casos, la composición farmacéutica comprende además al menos un agente citotóxico o un excipiente farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos.

55 En algunos casos, la presente divulgación proporciona también métodos de tratamiento, reducción o prevención de metástasis o invasión de un tumor en un paciente mamífero, comprendiendo dicho método: administrar a dicho paciente de una dosis eficaz del agente inhibidor de la presente invención. En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

60 En algunos casos, el tumor para su tratamiento es un tumor seleccionado del grupo que consiste en un tumor de ovario, un tumor de mama, un tumor de pulmón, un tumor de hígado, un tumor de colon, un tumor de vejiga, un tumor pancreático, un tumor de próstata y glioblastoma.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Describe los cuatro dominios de AXL y algunos casos de diversas combinaciones de construcciones de AXL-Fc que se han preparado y analizado.

Figura 2. Describe algunos casos de diversas combinaciones de construcciones AXL-Fc monovalentes.

Definiciones

En la descripción que se expone a continuación, se utiliza una serie de términos empleados convencionalmente en el campo del cultivo celular de forma generalizada. Para proporcionar una compresión clara y sólida de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, así como al alcance que se le da a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

"Inhibidores", "activadores" y "moduladores" de AXL en las células metastásicas o su ligando GAS7 se utilizan para referirse a moléculas inhibidoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas con el uso de ensayos *in vitro* e *in vivo* en cuanto a la unión o señalización de receptor o ligando, p.ej., ligandos, receptores, agonistas, antagonistas y sus homólogos o miméticos.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de dos o más restos aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoácidos es un mimético químico artificial del aminoácido de origen natural correspondiente, así como polímeros de aminoácido de origen natural y polímeros de aminoácido de origen no natural. Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se emplean indistintamente en el presente documento y se refieren a un polipéptido capaz de interactuar y/o que se une a otra molécula denominada generalmente antígeno. Los anticuerpos pueden incluir por ejemplo "polipéptidos de unión a antígeno" o "polipéptidos de unión a una molécula diana". Los antígenos de la presente invención pueden incluir por ejemplo cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural o sintético, así como análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los que están codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican después, p.ej., hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que el aminoácido que los aminoácidos de origen natural, es decir, un alfa carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p.ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (p.ej., norleucina) o cadenas principales de péptido modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácido se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural. Todas las letras sueltas utilizadas en la presente invención para representar aminoácidos se emplean de acuerdo con los símbolos para aminoácidos reconocidos empleados habitualmente en este campo, p.ej., A significa Alanina, C significa Cisteína, etc. Un aminoácido se representa con una letra mayúscula delante y detrás de la posición correspondiente para reflejar el cambio desde el aminoácido original (delante de la posición) en el aminoácido cambiado (detrás de la posición). Por ejemplo, A19T significa que un aminoácido alanina en la posición 19 cambia a treonina.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente", se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse al mamífero que se evalúa para su tratamiento y/o que se está tratando. En una realización, el mamífero es un ser humano. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" abarcan por tanto individuos que tienen cáncer, incluyendo sin limitación, adenocarcinoma de ovario o próstata, cáncer de mama, glioblastoma, etc., incluyendo aquellos que han sido sometidos o que son candidatos de extirpación (cirugía) para retirar el ejido canceroso. Los sujetos pueden ser humanos, aunque también incluyen otros mamíferos, en particular, los mamíferos utilizados como modelos de laboratorio para enfermedades humanas, p.ej., ratón, ratas, etc.

El término "tumor", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a todos los tipos de crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignos o benignos, así como todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

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

La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Éstos incluyen, sin limitación, crecimiento celular anormal o descontrolado, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células colindantes, liberación de citoquinas u otros productos de secreción a niveles anormales, supresión o agravamiento de respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de los tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como los nódulos linfáticos, etc.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones “recurrencia del cáncer” y “recurrencia del tumor”, así como las variantes gramaticales de los mismos, se refieren al crecimiento posterior de células neoplásicas o cancerosas tras el diagnóstico de cáncer. En particular, la recurrencia puede tener lugar cuando se produce un posterior crecimiento de células cancerosas en el tejido canceroso. La “propagación del tumor” tiene lugar igualmente cuando las células de un tumor se diseminan en tejidos y órganos locales o distantes; por lo tanto, la propagación de un tumor abarca metástasis de tumor. La “invasión del tumor” tiene lugar cuando el crecimiento del tumor se propaga hacia fuera de forma local comprometiendo la función de los tejidos implicados por compresión, destrucción o prevención de la función normal del órgano.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “metástasis” se refiere al crecimiento de un tumor canceroso en un órgano o parte del cuerpo que no está directamente conectado con el órgano del tumor canceroso original. Debe entenderse que metástasis incluye micrometástasis, que es la presencia de una cantidad no detectable de células cancerosas en un órgano o parte del cuerpo que no está directamente conectado con el órgano del tumor canceroso original. Metástasis puede definirse también como varias etapas de un proceso, como por ejemplo la salida de células cancerosas de un sitio tumoral original y la migración y/o invasión de células cancerosas a otras partes del cuerpo. Por lo tanto, la presente invención contempla un método para determinar el riesgo de un posterior crecimiento de uno o más tumores cancerosos en un órgano o una parte del cuerpo que no está directamente conectado con el órgano del tumor canceroso original y/o cualquier etapa del proceso que lleva a dicho crecimiento.

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

La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólidas como por ejemplo una muestra de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas del mismo y la progenie de las mismas. La definición incluye también muestras que han sido tratadas de algún modo tras su obtención, como por ejemplo por tratamiento con reactivos, lavado o enriquecimiento de ciertas poblaciones celulares, como células cancerosas. La definición incluye también una muestra que ha sido enriquecida con un tipo de moléculas en particular, p.ej., ácidos nucleicos, polipéptidos, etc. La expresión “muestra biológica” abarca una muestra clínica y también incluye tejido obtenido por extirpación quirúrgica, tejido obtenido por biopsia, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, muestras de tejido, órganos, médula ósea, sangre, suero de plasma y similares. Una “muestra biológica” incluye una muestra obtenida a partir de una célula cancerosa del paciente, p.ej., una muestra que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtiene de una célula cancerosa del paciente (p.ej. un lisado celular u otro extracto celular que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos); y una muestra que comprende células cancerosas de un paciente. Una muestra biológica que comprende una célula cancerosa de un paciente también puede incluir células no cancerosas.

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

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

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

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

"En combinación con", "terapia de combinación" y "productos de combinación" se refieren en ciertas realizaciones a la administración simultánea a un paciente de un primer terapéutico y los compuestos utilizados en el presente documento. Cuando se administran en combinación, es posible administrar cada uno de los componentes al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo. Por lo tanto, puede administrarse cada uno de los componentes por separado pero suficientemente próximos en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

De acuerdo con la presente invención, el primer terapéutico puede ser cualquier agente terapéutico adecuado, p.ej., agentes citotóxicos. Un ejemplo de clase de agentes citotóxicos son los agentes quimioterapéuticos, p.ej., pueden combinarse con el tratamiento para inhibir la señalización de AXL o GAS6. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen, pero sin limitarse a ellos, aldesleuquina, altretamina, amifostina, asparaginasa, bleomicina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cladribina, cisaprida, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, doxorubicina, dronabinol, duocarmicina, epoetina alfa, etoposida, filgrastim, fludarabina, fluorouracil, gemcitabina, granisetron, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, interferón alfa, irinotecan, lansoprazol, levamisol, leucovorina, megestrol, mesna, metotrexato, metoclopramida, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, omeprazol, ondansetron, paclitaxel (Taxol™), pilocarpina, procloroperacina, rituximab, saproina, tamoxifeno, taxol, clorhidrato de topotecano, trastuzumab, vinblastina, vincristina y tartato de vinorelbina. Para el tratamiento de cáncer de ovario, un agente quimioterapéutico preferente con el que se puede combinar un inhibidor de la señalización de AXL o GAS6 es paclitaxel (Taxol™).

Otras terapias de combinación son radiación, cirugía y privación hormonal (Kwon et al., Proc. Natl. Acad. Sci Estados Unidos, 96: 15074-9, 1999). Asimismo es posible combinar inhibidores de angiogénesis con los métodos de la invención.

"Administración concomitante" de un fármaco terapéutico contra el cáncer conocido con la composición farmacéutica de la invención significa la administración del fármaco y el inhibidor de AXL en períodos de tiempo adecuados para que el fármaco conocido y la composición de la presente invención tengan un efecto terapéutico. Dicha administración concomitante puede implicar la administración simultánea (es decir al mismo tiempo), previa o subsiguiente del fármaco con respecto a la administración de un compuesto de la presente invención. Las personas expertas en la materia no tendrán ninguna dificultad para determinar el momento, la secuencia y la posología de la administración para los fármacos en particular y las composiciones de la presente invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "supervivencia sin enfermedad" se refiere a la falta de recurrencia y/o propagación de dicho tumor y el futuro del paciente tras el diagnóstico, en lo que se refiere a los efectos del cáncer en el ciclo de vida del paciente. La expresión "supervivencia global" se refiere al futuro del paciente tras el diagnóstico a pesar de la posibilidad de que la causa de muerte en un paciente no se deba directamente a los efectos del cáncer. Las expresiones "probabilidad de supervivencia sin enfermedad", "riesgo de recurrencia" y variantes de las mismas se refieren a la probabilidad de recurrencia o propagación del tumor en un paciente tras el diagnóstico de cáncer, en el que la probabilidad se determina de acuerdo con el proceso de la invención.

Tal como se utiliza en el presente documento "se correlaciona con" "guarda una correlación con" y expresiones similares se refiere a una asociación estadística entre casos de dos eventos, incluyendo dichos eventos números, grupos de datos y similares. Por ejemplo, cuando los eventos implican números, una correlación positiva (también denominada en el presente documento "correlación directa") significa que cuando aumenta uno, el otro aumenta también. Una correlación negativa (también denominada en el presente documento "correlación inversa") significa que cuando uno aumenta, el otro disminuye.

"Unidad de diagnóstico" se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como dosis unitarias para un individuo en particular al que se va a tratar. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de compuesto(s) activo(s) calculada para producir el (los) efecto(s) terapéutico(s) deseado(s) en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosis unitarias viene dictada por (a) las características únicas del (los) compuesto(s) activo(s) y el(los) efecto(s) terapéuticos(s) en particular que se han de conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la especialidad de la composición de compuesto(s) activo(s).

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

Las expresiones “farmacéuticamente aceptable”, “físicamente tolerable” y variaciones gramaticales de los mismos, al referirse a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se emplean indistintamente y se refieren a que los materiales se pueden administrar a un ser humano sin que se produzcan efectos fisiológicos no deseables en un grado que pueda prohibir la administración de la composición.

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

Descripción detallada

AXL, MER y Tyro3 son tres proteínas receptoras de tirosina quinasa cuyo ligando es GAS6. Siendo así, la presente invención se basa en parte en el descubrimiento de agentes inhibidores que inhiben y/o antagonizan la interacción del receptor de AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre con el ligando GAS6.

De acuerdo con la presente divulgación que comprende la invención, dicho agente inhibidor puede seleccionarse entre (a) un inhibidor de la actividad de AXL, MER y/o Tyro3, (b) un inhibidor de la actividad de GAS6 y (c) un inhibidor de la interacción de AXL, MER y/o Tyro3-GAS6, en el que el agente inhibidor es capaz de unirse a GAS6 con mayor afinidad en comparación con AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, el agente inhibidor se une a dos o más epítopos en una sola molécula GAS6. Los dos o más epítopos pueden incluir al menos uno de los sitios de unión de AXL, MER y/o Tyro3 mayor y/o menor en GAS6. En algunos casos, los epítopos son epítopos separados o distintos. En algunos casos, los epítopos se superponen. En algunos casos, los epítopos no se solapan. En algunos casos, los epítopos son adyacentes. En algunas realizaciones, los epítopos no son adyacentes. En algunos casos, los epítopos incluyen el sitio de unión de AXL, MER y/o Tyro3 mayor y/o menor en GAS6. Estos epítopos de GAS6 a los que se unen los agentes inhibidores de la presente invención pueden estar localizados en una o más moléculas GAS6. En algunos casos, los epítopos están localizados en una sola molécula GAS6.

En algunos casos, el agente inhibidor es capaz de unirse a sitios de unión de AXL, MER y/o Tyro3 mayor y/o menor en una sola GAS6. En algunos casos, el agente inhibidor es capaz de unirse a un sitio de unión AXL, MER y/o Tyro3 mayor de GAS6 y uno o más epítopos GAS6 adicionales. En otros casos, el agente inhibidor es capaz de unirse al sitio de unión de AXL, MER y/o Tyro3 menor en GAS6 y uno o más epítopos adicionales. En algunos casos, el agente inhibidor es capaz de unirse a dos o más epítopos distintos en GAS6. Los epítopos de GAS6 adicionales pueden incluir cualquier epítipo en GAS6 que conduzca a una mayor afinidad y/o una mayor afección del agente inhibidor uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre. En algunos casos, los péptidos variantes de AXL, MER y/o Tyro3 de la presente divulgación que comprende la invención unen dos epítopos en una sola molécula GAS6. En algunos casos, los dos epítopos son sitios de unión de AXL, MER y/o Tyro3 mayor y menor.

De acuerdo con la divulgación que comprende la invención, los receptores de GAS6 incluyen AXL, MER y Tyro3. Los agentes inhibidores en algunos casos antagonizan la interacción GAS6/receptor mayor y/o menor. En algunos casos, el agente inhibidor es capaz de antagonizar la interacción de unión GAS6/receptor mayor y/o menor. En otros casos, el agente inhibidor es capaz de antagonizar la interacción de unión GAS6/receptor mayor (p.ej. interfiriendo y/o inhibiendo la Interacción de unión GAS6/receptor mayor). En algunos casos, el agente inhibidor es capaz de antagonizar la Interacción de unión GAS6/receptor menor (p.ej. interfiriendo y/o inhibiendo la interacción de unión GAS6/receptor menor).

Los agentes inhibidores pueden incluir también, por ejemplo, andamios de proteína (es decir, proteínas más pequeñas que son capaces de conseguir una afinidad comparable y especificidad utilizando estructuras moleculares que pueden ser por ejemplo la décima parte del tamaño de anticuerpos completos).

Los agentes inhibidores pueden incluir también polipéptidos no-anticuerpo. En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido no anticuerpo. En algunos casos, el polipéptido no anticuerpo puede incluir pero sin limitarse a ellos peptidocuerpos, darpinas, avímeros, adnectinas, anticalinas, Affibodies, Maxibodies u otro andamio estructural de la proteína o una combinación de los mismos.

En algunos casos, el agente inhibidor que proporciona la presente divulgación que comprende la invención es un péptido variante de AXL, MER y/o Tyro3, p.ej., polipéptido variante de AXL, MER y/o Tyro3 que tiene una actividad de unión a GAS6 que es sustancialmente igual o mejor que la actividad de unión a un polipéptido AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre. En algunos casos de la presente divulgación que comprende la invención, los polipéptidos variantes del AXL, MER y/o Tyro3 se utilizan como agentes terapéuticos.

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

Para los fines de la invención, la forma soluble de AXL (sAXL) es la porción del polipéptido que es suficiente para unir GAS6 con una afinidad reconocible, p.ej., alta afinidad, que está situada normalmente entre la secuencia de señal y el dominio de transmembrana, es decir, generalmente desde aproximadamente SEQ ID NO: 1, restos 19-437, pero que comprende o consiste esencialmente en una versión truncada desde aproximadamente el resto 19, 25, 30, 35, 40, 45, 50 a aproximadamente el resto 132, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 375, 350, a 321, p.ej. el resto 19-132. De acuerdo con los métodos de la presente invención, se puede utilizar el SEQ ID NO: 1 indistintamente con los aminoácidos 8-894 de SEQ ID NO: 1, que se refieren ambos a la secuencia de AXL de tipo silvestre. En algunos casos, la forma soluble de AXL carece del dominio de transmembrana y, opcionalmente, el dominio intracelular.

En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido variante de AXL soluble que carece del dominio de transmembrana de AXL y tiene al menos una mutación en relación con el tipo silvestre que aumenta la afinidad del polipéptido de AXL uniéndose a GAS6 en comparación con GAS6 de tipo silvestre.

La proteína MER, haciendo referencia al SEQ ID NO: 2 nativa, comprende un dominio de tipo inmunoglobulina (Ig) desde los restos 81-186, un segundo dominio de tipo Ig desde los restos 197-273, 3 dominios de tipo fibronectina desde los restos 284-379 y 383-482, dominio intracelular desde los restos 527-999 incluyendo dominio de tirosina quinasa. Los restos de tirosina 749, 753, 754 y 872 se autofosforilan tras la dimerización del receptor y sirven como sitios de amarre para moléculas de señalización intracelular.

Para los fines de la invención, una forma soluble de MER (sMER) es la porción del polipéptido que es suficiente para unir GAS6 con una afinidad reconocible, p.ej., alta afinidad, que está situada normalmente entre la secuencia de señal y el dominio de transmembrana, es decir, generalmente desde aproximadamente SEQ ID NO: 2 restos 21-526, pero que puede comprender o consistir esencialmente en una versión truncada. En algunos casos, una forma soluble de MER carece del dominio de transmembrana (es decir, generalmente desde aproximadamente SEQ ID NO: 2 restos 506-526) y, opcionalmente, el dominio intracelular (es decir, generalmente desde aproximadamente SEQ ID NO: 2 restos 527-999).

En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido variante de MER soluble en el que dicho polipéptido de MER carece del dominio de transmembrana de MER y tiene al menos una mutación en relación con el tipo silvestre que aumenta la afinidad del polipéptido MER uniéndose a GAS6 en comparación con MER de tipo silvestre.

La proteína Tyro3, haciendo referencia al SEQ ID NO: 3 nativa, comprende un dominio de tipo inmunoglobulina (Ig) desde los restos 41-128, un segundo dominio de tipo Ig desde los restos 139-220, 3 dominios de tipo fibronectina desde los restos 225-317 y 322-413, dominio intracelular desde los restos 451-890 incluyendo dominio de tirosina quinasa. Los restos de tirosina en el dominio 681, 685, 686 y 804 se autofosforilan tras la dimerización del receptor y sirven como sitios de amarre para moléculas de señalización intracelular.

Para los fines de la invención, una forma soluble de Tyro3 (sTyro3) es la porción del polipéptido Tyro3 que es suficiente para unir GAS6 con una afinidad reconocible, p.ej., alta afinidad, que está situada normalmente entre la secuencia de señal y el dominio de transmembrana, es decir generalmente desde aproximadamente SEQ ID NO: 3 restos 41-450, pero que pueden comprender o consistir esencialmente una versión truncada. En algunas realizaciones, una forma soluble de AXL carece del dominio de transmembrana (es decir, generalmente desde aproximadamente SEQ ID NO: 3 restos 430-450) y, opcionalmente, el dominio intracelular (es decir, generalmente desde aproximadamente SEQ ID NO: 3 restos 451-890).

En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido variante de Tyro3 soluble en el que dicho polipéptido de Tyro3 carece del dominio de transmembrana de Tyro3 y tiene al menos una mutación en relación con Tyro3 de tipo silvestre que aumenta la afinidad del polipéptido Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MET o Tyro3 carece del dominio de transmembrana de AXL, MET o Tyro3 y es un polipéptido variante soluble, p.ej. un polipéptido variante sAXL, sMER o sTyro3.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece del dominio intracelular de AXL, MER o Tyro3.

En algunos casos, el agente inhibidor de la presente invención inhibe la unión entre un polipéptido de AXL, MER y/o Tyro3 tipo silvestre y una proteína GAS6 *in vivo* o *in vitro*. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o

Tyro3 inhibe la unión entre un polipéptido de AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre y una proteína GAS6 *in vivo* o *in vitro*.

Los agentes inhibidores de la presente invención pueden presentar un perfil fármaco-cinético mejor o potenciado. En algunos casos el perfil fármaco-cinético mejor o mejorado incluye por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, un mejor perfil de absorción, un mejor perfil de distribución, un mejor perfil de metabolismo, un mejor perfil de excreción, un mejor perfil de liberación, una mayor semi-vida, una menor semi-vida, una velocidad de acción más rápida, una duración del efecto más larga en comparación con los polipéptidos de AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre que no carecen de un dominio de transmembrana. Las personas expertas en la materia comprenderán los parámetros de los perfiles fármaco-cinéticos preferentes para cada necesidad en particular, incluyendo por ejemplo regímenes de tratamiento, y cómo implementar apropiadamente dichos parámetros en regímenes de tratamiento.

AXL, MER y Tyro3 de tipo silvestre contienen todos ellos dominios de fibronectina. En algunos casos los polipéptidos de AXL, MER y Tyro3 de la divulgación que comprende la invención carecen de un dominio de fibronectina funcional (FN). Carece de o que carece de un dominio de fibronectina funcional puede incluir, pero sin limitarse a ellos, supresión de uno o ambos dominios de fibronectina y/o introducción de mutaciones que inhiben, reducen o eliminan la funcionalidad de uno o ambos dominios de fibronectina, en los que dichas mutaciones pueden incluir por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, mutaciones de sustitución, supresión e inserción. En algunos casos, los polipéptidos de la invención tienen la fibronectina 1 (FN1) suprimida, la fibronectina 2 (FN2) suprimida, o FN1 y FN 2 ambas suprimidas. En algunos casos, los polipéptidos de la invención tienen porciones de FN1 mutadas y/o suprimidas, FN2 mutadas y/o suprimida, o FN1 y FN2 mutadas y/o suprimidas.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece de un dominio de fibronectina funcional (FN) de AXL, MER o Tyro3. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece de un dominio de fibronectina funcional (FN) presenta también una mayor afinidad del polipéptido uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, la falta de un dominio de fibronectina funcional tiene como resultado una mayor afinidad del polipéptido de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6. En algunos casos, la falta de un dominio de fibronectina funcional tiene como resultado un perfil fármaco-cinético mejor o potenciado, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, un mejor perfil de absorción, un mejor perfil de distribución, un mejor perfil de metabolismo, un mejor perfil de excreción, un mejor perfil de liberación, una mayor semi-vida, una menor semi-vida, una velocidad de acción más rápida, una duración del efecto más larga en comparación con otros polipéptidos de tipo silvestre u otros polipéptidos que no carecen de un dominio de fibronectina funcional. Las personas expertas en la materia comprenderán los parámetros de los perfiles fármaco-cinéticos preferentes para cada necesidad en particular, incluyendo por ejemplo regímenes de tratamiento, y cómo implementar apropiadamente dichos parámetros en regímenes de tratamiento.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece del dominio de transmembrana y tiene más de un dominio Ig1 y presenta una mayor afinidad del polipéptido de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre. En algunos casos, el polipéptido AXL, MER o Tyro3 tiene dos dominios Ig1. En algunos casos, el polipéptido de AXL, MER o Tyro3 tiene tres dominios Ig1. En algunos casos, el polipéptido de AXL, MER o Tyro3 tiene más de un dominio Ig1 y/o más de un dominio Ig2. En algunos casos, el polipéptido de AXL, MER o Tyro3 tiene dos dominios Ig2s. En algunos casos, el polipéptido de AXL, MER o Tyro3 incluye por ejemplo pero sin limitarse a ellos una de las siguientes configuraciones de dominio Ig, así como cualquiera de las combinaciones de variaciones de los mismos:

- Ig1
- Ig1 - Ig2
- Ig1 - Ig1
- Ig1 - Ig1 - Ig1
- Ig1 - Ig2 - Ig1
- Ig1 - Ig2 - Ig1 - Ig2

En algunos casos, el polipéptido de AXL, MER o Tyro3 carece también del dominio de transmembrana de AXL, MER o Tyro3 y/o presenta una mayor afinidad del polipéptido AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece del dominio de transmembrana, tiene más de un dominio Ig1, tiene más de un dominio Ig2 y presenta una mayor afinidad del polipéptido de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre.

En algunos casos, AXL, MER o Tyro3 tiene los dominios inmunoglobulina conectados directamente entre sí. En algunas realizaciones, AXL, MER o Tyro3 tiene los dominios de inmunoglobulina conectados indirectamente, p.ej., a través de una molécula de enlazador que incluye por ejemplo cualquiera de los enlazadores de aminoácido conocidos en la técnica.

En algunos casos, el uno o más dominio de Ig1 de AXL, MER o Tyro3 y/o 1 o más dominios Ig2 AXL, MER o Tyro3 tiene como resultado un perfil fármaco-cinético mejor o potenciado, incluyendo por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, un mejor perfil de absorción, un mejor perfil de distribución, un mejor perfil de metabolismo, un mejor perfil de excreción, un mejor perfil de liberación, una mayor semi-vida, una menor semi-vida, una velocidad de acción más

- 5 rápida, una duración del efecto más larga en comparación con otros polipéptidos de tipo silvestre que no carecen de un dominio de fibronectina funcional. Las personas expertas en la materia comprenderán los parámetros de los perfiles fármaco-cinéticos preferentes para cada necesidad en particular, incluyendo por ejemplo regímenes de tratamiento, y cómo implementar apropiadamente dichos parámetros en regímenes de tratamiento.
- 10 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece del dominio de transmembrana de AXL, MER o Tyro3 y es capaz de unirse a uno o más epítomos en una sola GAS6. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 carece del dominio de transmembrana de AXL, MER o Tyro3 y es capaz de unirse a ambos sitios de unión de AXL, MER y/o Tyro3 mayor y menor en una sola GAS6. En algunos casos, la unión AXL, MER y/o Tyro3 a los sitios de unión tanto mayor como menor es simultánea. En algunos casos, la unión de sitios de unión de AXL,
- 15 MER y/o Tyro3 tanto mayor como menor es simultánea en una sola GAS6.

La presente divulgación que comprende la invención también proporciona el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s que no se une a dos epítomos en una sola molécula de GAS6. La presente divulgación que comprende la invención proporciona también el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s que no se une a dos epítomos en una

20 sola molécula de GAS6 simultáneamente. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER y/o Tyro3 no es capaz de unirse a dos epítomos en una sola GAS6, esto incluye por ejemplo polipéptidos variantes AXL, MER y/o Tyro3 monoméricos. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 monomérico comprende un dominio Ig1. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER y/o Tyro3 monomérico es un polipéptido de fusión Fc que no se une a más de un sitio en una sola molécula de GAS6 simultáneamente. En algunos casos, el

25 polipéptido variante de AXL, MER y/o Tyro3 monomérico que no es capaz de unirse a dos epítomos en una sola GAS6 comprende dos polipéptidos variantes de AXL, MER y/o Tyro3 que no son ninguno de los dos capaces de unirse a dos epítomos en una sola GAS6 simultáneamente. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER y/o Tyro3 que no es capaz de unirse simultáneamente a dos epítomos en una sola GAS6 tiene un dominio Ig1. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER y/o Tyro3 monomérico que no es capaz de unirse

30 simultáneamente a dos epítomos en una sola GAS6 tiene una semi-vida alterada en comparación con polipéptidos variantes de AXL, MER y/o Tyro3 que son capaces de unirse a dos epítomos en una sola GAS6. En algunos casos, el polipéptido tiene un dominio Ig1 y carece de un dominio Ig2 funcional. En algunos casos, el dominio Ig1 comprende aminoácidos 1-131 de AXL (SEQ ID NO: 1; o en algunos casos 8-138 de SEQ ID NO: 1). En algunos casos, el polipéptido es un polipéptido variante soluble de AXL, MER o Tyro3, en el que dicho polipéptido variante de

35 AXL, MER o Tyro3 soluble carece del dominio de transmembrana de AXL, MER o Tyro3, tiene un dominio Ig1, carece de un dominio Ig2 funcional y en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre. En algunos casos, el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido es un polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 soluble, en el que dicho polipéptido variante de AXL,

40 MER o Tyro3 soluble carece del dominio de transmembrana de AXL, MER o Tyro3, carece de un dominio fibronectina funcional (FN), tiene un dominio Ig1, carece de un dominio Ig2 funcional y en el que dicho polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre.

45 AXL, MER y Tyro3 de tipo silvestre contienen todos ellos un dominio Ig2. En algunos casos, los polipéptidos de AXL, MER y Tyro3 de la divulgación que comprende invención carecen de un dominio Ig2 funcional. Carece de o que carece de un dominio Ig2 funcional puede incluir, pero sin limitarse a ellos, supresión del dominio Ig2 y/o introducción de mutaciones que inhiben, reducen o eliminan la funcionalidad del dominio Ig2, en los que las mutaciones pueden incluir por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, sustitución, supresión e inserción de mutaciones.

50 En algunos casos, los polipéptidos de la invención carecen de un dominio Ig2 funcional. En algunos casos, los polipéptidos de la invención carecen de un dominio Ig2 funcional y tienen un dominio Ig1 de AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre. En algunos casos, los polipéptidos de la invención carecen de un dominio Ig2 funcional y tienen uno o más mutaciones en el dominio Ig1 en relación con el dominio Ig1 de AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre.

55 En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER y/o Tyro3 incluye un enlazador. Dentro de la técnica, se conocen una amplia variedad de enlazadores y se puede emplear cualquiera de los enlazadores conocidos con los métodos de la presente invención. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 incluye uno o más enlazadores o unidades de enlazador. En algunos casos, el enlazador es un enlazador de aminoácido, incluyendo una secuencia de aminoácidos de 2, 3, 4 o 5 aminoácidos que son diferentes a las secuencias de AXL,

60 MER y/o Tyro3 de tipo silvestre. En algunos casos, el enlazador tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más unidades. En algunas realizaciones, el enlazador es (GLY)₄SER (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, el enlazador tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más unidades (GLY)₄SER. En algunos casos, el enlazador tiene 1, 2, 3 o 5 unidades (GLY)₄SER. En algunos casos, los enlazadores están entre el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 y la porción Fc de un polipéptido de fusión. En algunos casos, los enlazadores están entre el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 y la porción Fc de un polipéptido de fusión y la variante de polipéptido de AXL, MER o Tyro3 carece de un dominio de fibronectina funcional.

65

En algunos casos, los polipéptidos variantes de AXL, MER y/o Tyro3 de la presente invención incluyen también una o más modificaciones de aminoácidos dentro de la forma soluble de AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre, p.ej., una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan su afinidad para GAS6. De acuerdo con la presente divulgación que comprende la invención, la modificación de aminoácidos incluye cualquier modificación natural o artificial de aminoácidos conocidas o que se pueda descubrir más adelante en el campo. En algunos casos, la modificación de aminoácidos incluye cualquier mutación natural, p.ej., sustitución, supresión, adición, inserción, etc. En otras realizaciones, la modificación de aminoácidos incluye el reemplazamiento de aminoácidos existentes con otro aminoácido, p.ej., un equivalente conservador de los mismos. En otros casos más aún, la modificación de aminoácidos incluye el reemplazamiento de uno o más aminoácidos existentes con aminoácidos no naturales o inserción de uno o más aminoácidos no naturales. En otros casos más aún, las modificaciones de aminoácidos incluyen al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o 10 mutaciones o cambios de aminoácidos.

En algunos casos ilustrativos, se pueden utilizar una o más modificaciones de aminoácidos para alterar las propiedades de la forma soluble de AXL, MER y/o Tyro3, p.ej., que afectan a la estabilidad, la actividad de unión y/o la especificidad, etc. Se conocen las técnicas para mutagénesis *in vitro* de genes clonados. Se pueden encontrar ejemplos de protocolos para explorar mutaciones en Gustin et al., *Biotechniques* 14:22 (1993); Barany, *Gene* 37:111-23 (1985); Colicelli et al., *Mol Gen Genet* 199:537-9 (1985); y Prentki et al., *Gene* 29:303-13 (1984). Los métodos de mutagénesis específica de sitio se pueden encontrar en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, pp. 15.3-15.108; Weiner et al., *Gene* 126:35-41 (1993); Sayers et al., *Biotechniques* 13:592-6 (1992); Jones y Winistorfer, *Biotechniques* 12:528-30 (1992); Barton et al., *Nucleic Acids Res* 18:7349-55 (1990); Marotti y Tomich, *Gene Anal Tech* 6:67-70 (1989); y Zhu *Anal Biochem* 177:120-4 (1989).

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

En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL incluyen uno o más modificaciones de aminoácidos incluyendo sin limitación 1) A19T, 2) T23M, 3) E26G, 4) E27G o 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 o I90V, 19) V92A, V92G o V92D, 20) I97R, 21) T98A o T98P, 22) T105M, 23) Q109R, 24) V112A, 25) F113L, 26) H116R, 27) T118A, 28) G127R o G127E, y 29) E129K y una combinación de los mismos.

En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL de la presente invención incluyen una o más modificaciones de aminoácidos en la posición 32, 87, 92, o 127 de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej., G32S; D87G; V92A y/o G127R. En algunos casos más, los polipéptidos variantes de AXL incluyen uno o más modificaciones de aminoácidos en la posición 26, 79, 92, 127 de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej., E26G, V79M; V92A y/o G127E. En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL incluyen una o más modificaciones de aminoácidos en la posición 32, 87, 92, 127 y/o 72 de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej. G32S; D87G; V92A; G127R y/o A72V. En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL incluyen una o más modificaciones de aminoácidos en la posición 87, 92 y/o 127 del AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej., D87G; V92A; y/o G127R. En algunos casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL incluyen una o más modificaciones de aminoácidos en la posición 32, 92 y/o 127 de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej. G32S; V92A; y/o G127R. En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL de la presente invención incluyen una o más modificaciones de aminoácidos en la posición 32, 87 y/o 127 de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej., G32S; D87G; y/o G127R. En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL de la presente invención incluyen una o más modificaciones de aminoácidos en la posición 32, 87 y/o 92 de tipo silvestre AXL (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej., G32S; D87G; y/o V92A. En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL incluyen una o más modificaciones de aminoácidos en la posición 26, 79, 92, 127 de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej., E26G, V79M; V92A y/o G127E. En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL de la presente invención incluyen una o más modificaciones de aminoácidos en la posición 87 y 92 de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) o una combinación de los mismos, p.ej., D87G y V92A. En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL de la presente invención incluyen al menos una modificación de aminoácido en la posición 72 de AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), p.ej., A72V.

De acuerdo con la presente divulgación que comprende la invención, el agente inhibidor puede incluir pero sin limitarse a ellos un polipéptido, una fusión de polipéptido-vehículo, una fusión de polipéptido-Fc, un conjugado de polipéptido, un conjugado de polipéptido-fármaco, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un conjugado

anticuerpo-fármaco, un fragmento de anticuerpo, una estructura relacionada con anticuerpo o una combinación de los mismos.

Los agentes inhibidores pueden incluir péptidos o polipéptidos. Los péptidos y polipéptidos de la presente invención pueden incluir polipéptidos naturales y/o sintéticos. Los polipéptidos sintéticos y los métodos para preparar polipéptidos sintéticos son muy conocidos en la técnica y se puede emplear cualquier método conocido para preparar polipéptidos sintéticos con los métodos. En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido natural o sintético. En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido de fusión, natural o sintético. En algunos casos, el agente inhibidor es un polipéptido de fusión Fc natural o sintético. En algunos casos, el polipéptido de fusión, natural o sintético, es una fusión con otra clase estructural o andamio de proteína o un polipéptido de fusión natural o sintético con un polímero o hidrogel o estructura relacionada.

De acuerdo con la presente divulgación que comprende la invención, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s de la presente invención puede modificarse además, p.ej., unido a una amplia variedad de otros oligopéptidos o proteínas para diversos fines. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo varias modificaciones post-traducción o post-expresión con respecto al polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s de la presente invención. Por ejemplo, empleando las secuencias de codificación adecuadas, es posible proporcionar farnesilación o prenilación. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s de la presente invención puede estar PEGilado, según lo cual el grupo polietileno proporciona una potenciación de la semi-vida en el torrente sanguíneo. El polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s de la presente invención puede combinarse también con otras proteínas, como Fc de un isotipo de IgG, que puede ser de unión complementaria con una toxina, como ricina, abrina, toxina de la difteria o similares, o con un agente de unión específico que permite dirigir fracciones específicas a una célula diana. Los agentes inhibidores pueden incluir conjugados de polipéptido y conjugados de anticuerpo. En algunos casos, el agente inhibidor es un conjugado de polipéptido o un conjugado de anticuerpo. En algunos casos, el conjugado de polipéptido es un conjugado de fármaco. En algunos casos, el conjugado de péptido o polipéptido es un conjugado de anticuerpo-fármaco. En algunos casos, el conjugado de polipéptido es un conjugado de polímero. Los polímeros incluyen pero no se limitan a PEG, polímeros que contienen PEG, polímeros degradables, polímeros biocompatibles, hidrogeles, así como otras estructuras de polímero que podrían estar conjugadas con un polipéptido y pueden incluir combinaciones de los mismos.

En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 de la presente divulgación que comprende la invención es una proteína de fusión, p.ej. fusionada en marco con un segundo polipéptido. En algunos casos, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, p.ej. para que la proteína de fusión no desaparezca de la circulación rápidamente. En otros casos, el segundo polipéptido es parte de la región Fc o su totalidad. En otros casos, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, p.ej., proporcionando un mayor tamaño y/o unión adicional o interacción con moléculas Ig. En otras realizaciones más, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una proteína de albúmina, p.ej., una proteína albúmina de suero humana. En algunos casos, el segundo polipéptido es una proteína o péptido que se une a una albúmina.

En otros casos, el segundo polipéptido es útil para tratar el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s, p.ej. purificación del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s o para aumentar la estabilidad *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se puede combinar el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s de la presente invención con partes del dominio constante de inmunoglobulina (IgG) que tiene como resultado polipéptidos quiméricos o de fusión. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y presentan una mayor semi-vida *in vivo*. Un ejemplo notificado describe proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios de polipéptido CD4- humano y varios dominios constantes de regiones de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas de mamífero. Patente europea EP A 394.827; Trauneker et al., Nature, 331: 84-86, 1988. Las proteínas de fusión que tienen estructuras diméricas ligadas a disulfuro (debido a IgG) también pueden ser más eficientes en la unión y neutralización de otras moléculas que las proteínas secretadas monoméricas o el fragmento de proteína en solitario. Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964, 1995.

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

En algunos casos más aún, el segundo polipéptido es una entidad útil para mejorar las características de los polipéptidos variantes AXL, MER o Tyro3 de la presente invención. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, en particular, aminoácidos cargados en el término N del polipéptido para mejorar la estabilidad y la persistencia durante la purificación desde una célula hospedadora o el tratamiento posterior y el almacenamiento. Asimismo, es posible añadir fracciones de péptido a los polipéptidos variantes AXL, MER o Tyro3

de la presente invención para facilitar la purificación y separarlos a continuación para la preparación final del polipéptido. La adición de fracciones de péptido para facilitar el tratamiento de polipéptidos es conocida y constituyen técnicas habituales en la especialidad.

- 5 En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s de la presente divulgación que comprende la invención tiene una actividad de unión a GAS6 que es al menos igual o mejor que AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre. En otros casos, los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s tienen una actividad de unión o afinidad con GAS6 que es al menos 1-vez, 2-veces, 3- veces, 4- veces, 5- veces, o 6- veces más que la de AXL, MER o Tyro3 tipo silvestre. En otros casos, los polipéptidos variantes AXL, MER o Tyro3 tienen una actividad de
10 unión o afinidad con GAS6 de al menos aproximadamente 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} o 1×10^{-9} M 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M o 1×10^{-12} M. En otros casos más aún, los polipéptidos AXL de la presente invención son capaces de inhibir, inhiben o compiten con AXL de tipo silvestre uniéndose a GAS6 ya sea *in vivo*, *in vitro* o ambos. En otros casos más, los polipéptidos AXL de la presente invención inhiben o compiten con la unión de AXL S6-1, AXL S6-2, y/o AXL S6-5 (tal como se describe en la patente internacional WO2011/091305). En otros casos más aún, los polipéptidos AXL de la
15 presente invención inhiben o compiten con la unión de cualquier variante de AXL, tal como se describe en la patente internacional WO2011/091305.

- Los agentes inhibidores de la presente divulgación que comprende la invención se unen a GAS6 con mayor afinidad. En algunos casos, el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una mayor afinidad del polipéptido de AXL, MER o Tyro3 uniéndose a GAS6 en comparación con AXL, MER o Tyro3 de tipo silvestre. En algunos casos, el
20 polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3 presenta una afinidad con GAS6 que es al menos aproximadamente 5-veces más fuerte, al menos aproximadamente 10- veces más fuerte o al menos aproximadamente 20- veces más fuerte, 50- veces más fuerte, 100- veces más fuerte o al menos 200- veces más fuerte, etc. que la afinidad del polipéptido de AXL, MER o Tyro3 tipo silvestre. En algunos casos, el AXL soluble tiene una afinidad con GAS6 aproximadamente a 115- veces más fuerte que la afinidad del polipéptido AXL de tipo silvestre.
25

- La capacidad de una molécula para unirse a GAS6 se puede determinar por ejemplo según la capacidad del ligando putativo de unirse a GAS6 que reviste una placa de ensayo. En un caso, se puede determinar por ensayo la actividad de unión del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s con GAS6 inmovilizando el ligando, p.ej., GAS6 o
30 el polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3. Por ejemplo, el ensayo puede incluir la inmovilización de GAS6 fusionado con un marcador His en perlas de resina NTA activadas con Ni. Se pueden añadir los agentes en un tampón apropiado e incubar las perlas durante un período de tiempo y a una temperatura determinada. Tras los lavados para eliminar el material sin unir, se puede liberar la proteína unida, por ejemplo por SDS, tampones con un pH alto y similares, y analizarse.
35

- En otros casos más, los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s tienen una mejor estabilidad térmica que la estabilidad térmica de AXL de tipo silvestre. En algunos casos, la temperatura de fusión del polipéptido variante de AXL, MER o Tyro3s de la presente invención es al menos 5 °C, 10 °C, 15 °C o 20 °C más que la temperatura de fusión de AXL de tipo silvestre.
40

- De acuerdo con la presente divulgación, los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s pueden incluir también una o más modificaciones que no alteran las secuencias primarias de los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 de la presente invención. Por ejemplo, dichas modificaciones pueden incluir derivación química de polipéptidos, p.ej., acetilación, amidación, carboxilación, etc. Dichas modificaciones pueden incluir también
45 modificaciones de glucosilación, p.ej., las obtenidas por modificación de patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en otras etapas de procesamiento; p.ej., por exposición del polipéptido a enzimas que afectan a la glucosilación, como por ejemplo enzimas de glucosilación y desglucosilación de mamífero. En algunos casos, los polipéptidos variantes AXL, MER o Tyro3 incluyen polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 que tienen restos de restos de aminoácido fosforilados, p.ej., fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.
50

- En algunos casos más, los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s incluyen polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 modificados además para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacer que sean más adecuados como agentes terapéuticos. Por ejemplo, los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 incluyen además análogos de polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 que contienen restos diferentes a los L-aminoácidos de origen natural, p.ej., D-aminoácidos y aminoácidos sintéticos que no tienen un origen natural. Los D-aminoácidos pueden estar sustituidos en algunos o todos los restos de aminoácidos.
55

- En otros casos más aún, los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s incluyen al menos dos polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 iguales o diferentes unidos covalentemente o no covalentemente. Por ejemplo, en algunos casos, los polipéptidos variantes AXL, MER o Tyro3 de la presente invención incluyen dos, tres, cuatro, cinco o seis polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s iguales o diferentes unidos covalentemente, p.ej., para tener un tamaño apropiado, pero evitando una agregación no deseada.
60

- De acuerdo con la presente invención, los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 de la presente invención pueden producirse a través de cualquier medio adecuado conocido o que se pueda descubrir en este campo más
65

adelante, p.ej., se pueden producir a través de células eucariotas o procariotas, sintetizar *in vitro*, etc. Cuando se produce la proteína a partir de células procariotas, se puede procesar además por desplegamiento, p.ej., desnaturalización térmica, reducción DTT, etc., y puede redoblar aplicando métodos conocidos en la técnica.

Los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 pueden prepararse por síntesis *in vitro* utilizando métodos convencionales conocidos dentro de la técnica. En el mercado, están disponibles varios aparatos de síntesis, como por ejemplo sintetizadores automáticos de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckman, etc. Al utilizar sintetizadores, es posible sustituir aminoácidos de origen natural por aminoácidos no naturales. La secuencia en particular y la forma de preparación pueden determinarse según sea conveniente, desde el punto de vista económico, según la pureza requerida, y similares.

Asimismo, es posible aislar y purificar los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3 de acuerdo con los métodos convencionales de síntesis recombinante. Se puede preparar un lisado del huésped de expresión y purificar el lisado por HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis de gel, cromatografía de afinidad u otras técnicas de purificación. En su mayoría, las composiciones que se utilizan comprenderán al menos un 20 % en peso del producto deseado, más habitualmente al menos aproximadamente 75 % en peso, preferentemente, al menos aproximadamente 95 % en peso y, para fines terapéuticos, habitualmente al menos aproximadamente 99,5 % en peso, en relación con los agentes contaminantes relacionados con el método de preparación del producto y su purificación. Normalmente, los porcentajes se basarán en el total de proteína.

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

Se pueden aislar ácidos nucleicos y obtenerse con una sustancial pureza. Normalmente, los ácidos nucleicos, ya sean como ADN o ARN, pueden obtenerse sustancialmente desprovistos de otras secuencias de ácidos nucleicos de origen natural, que tienen generalmente al menos aproximadamente un 50 %, normalmente al menos aproximadamente 90 % de pureza y son normalmente "recombinantes", p.ej., flanqueados por uno o más nucleótidos con los que no están asociados normalmente en un cromosoma de origen natural. Los ácidos nucleicos de la invención pueden proporcionarse como una molécula lineal o dentro de una molécula circular y se pueden proporcionar dentro de moléculas de replicación autónoma (vectores) o dentro de moléculas sin secuencias de replicación. La expresión de ácidos nucleicos puede regularse por sus propias secuencias o por otras conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos de la invención pueden introducirse en células hospedadoras adecuadas utilizando diversas técnicas disponibles en la especialidad, tales como transferencia de ADN mediada por polietilenglicol de transferrina, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, transferencia de ADN mediada por liposoma, transporte intracelular de perlas de látex revestidas con ADN, fusión de protoplasto, infección viral, electroporación, pistola génica, transfección mediada por fosfato cálcico y similares.

En algunos casos, la presente divulgación proporciona vectores de expresión para expresión *in vivo* o *in vitro* de uno o más polipéptidos variantes de AXL, MER y/o Tyro3 de la presente invención, ya sea constitutivamente o en virtud de uno o más elementos reguladores. En algunos casos, la presente divulgación proporciona una población celular que comprende uno o más vectores de expresión para expresar los polipéptidos variantes de AXL, MER y/o Tyro3 de la presente invención, ya sea constitutivamente o en virtud de uno o más elementos reguladores.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporcionan anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a proteína GAS6. GAS6 (6 específica de detención de crecimiento) pertenece estructuralmente a la familia de proteínas dependientes de vitamina K del plasma. GAS6 tiene una homología estructural con la proteína S anticoagulante natural, ya que comparte la misma composición modular y tiene un 40 % de identidad de secuencia. GAS6 tiene propiedades de tipo factor de crecimiento a través de su interacción con receptores de tirosina quinasa de la familia TAM; Tyro3, AXL y MER. GAS6 humana es una proteína de 678 aminoácidos que consiste en un dominio rico en gamma carboxiglutamato (Gla) que media la unión de membranas de fosfolípido, cuatro dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico y dos dominios de tipo laminina G (LG). Puede accederse a la secuencia de las variantes de transcrito de GAS6 humana en el Genbank at NM_001143946.1; NM_001143945.1; y NM_000820.2, respectivamente.

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

De acuerdo con la presente divulgación, los anticuerpos aislados incluyen cualquier anticuerpo aislado con una especificidad de unión reconocible contra GAS6. En algunos casos, los anticuerpos aislados son anticuerpos parcial o completamente humanizados. En otros casos, los anticuerpos aislados son anticuerpos monoclonales o policlonales. En otros casos más aún, los anticuerpos aislados son anticuerpos quiméricos, p.ej., con regiones consistentes, regiones variables y/o CDR3 o una combinación de las mismas, a partir de diferentes fuentes. En otros casos más aún, los anticuerpos aislados son una combinación de varias de las características descritas en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención, los fragmentos de los anticuerpos aislados incluyen un polipéptido que contiene una región del anticuerpo (ya sea en el contexto de un andamio de anticuerpo o un andamio que no es de anticuerpo) que es suficiente o necesario para la unión específica reconocible del polipéptido hacia GAS6. En algunos casos, los fragmentos de los anticuerpos aislados incluyen cadenas ligeras variables, cadenas pesadas variables, una o más CDR de cadena pesada o cadena ligera o combinaciones de las mismas, p.ej., Fab, Fv, etc. En algunos casos, los fragmentos de los anticuerpos aislados incluyen un polipéptido que contiene un anticuerpo de una sola cadena, p.ej., ScFv. En otros casos más, los fragmentos de anticuerpos aislados incluyen regiones variables únicamente o regiones variables en combinación con parte de la región Fc, p.ej., región CH1. En otros casos más, los fragmentos de los anticuerpos aislados incluyen minicuerpos, p.ej., VL-VH-CH3 o diacuerpos.

En algunos casos, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido en una o más regiones de aminoácidos que interactúan con AXL, MER y/o Tyro3 o presentado por ellas. En algunos casos, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendidos en una o más regiones de aminoácidos de GAS6, o presentado por ellas, p.ej., L295-T317, E356-P372, R389-N396, D398-A406, E413-H429, y W450-M468 de GAS6.

En otros casos más aún, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido en una o más regiones de aminoácidos o presentado por ellas, p.ej., LRMFSGTPVIRLRFKRLQPT (SEQ ID NO: 4), EIVGRVTSSGP (SEQ ID NO: 5), RNLVIKVN (SEQ ID NO: 6), DAVMKIAVA (SEQ ID NO: 7), ERGLYHLNLTVGIPFH (SEQ ID NO: 8), y WLNGEDTTIQETVVNRM (SEQ ID NO: 9).

En otros casos más aún, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido o presentado por al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos en la región de L295-T317, E356-P372, R389-N396, D398-A406, E413-H429, y W450-M468 de GAS6. En otros casos más aún, los anticuerpos aislados se unen a un epítipo comprendido o presentado por al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos en una región de LRMFSGTPVIRLRFKRLQPT (SEQ ID NO: 4), EIVGRVTSSGP (SEQ ID NO: 5), RNLVIKVN (SEQ ID NO: 6), DAVMKIAVA (SEQ ID NO: 7), ERGLYHLNLTVGIPFH (SEQ ID NO: 8) y WLNGEDTTIQETVVNRM (SEQ ID NO: 9).

En otros casos más aún, los anticuerpos aislados son capaces de inhibir (inhiben o compiten) la unión entre los polipéptidos variantes AXL, MER y/o Tyro3 o AXL, MER y/o Tyro3 de tipo silvestre de la presente invención y GAS6.

De acuerdo con la presente divulgación, se puede proporcionar los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s y anticuerpos aislados de la presente invención en composiciones farmacéuticas adecuadas para uso terapéutico, p.ej., para tratamiento humano. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades de la presente invención, p.ej., polipéptidos variantes de AXL y/o anticuerpos aislados contra GAS6 o sales, ésteres o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos o cualquier profármaco de los mismos. En otros casos más, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente invención en combinación con otro agente citotóxico, p.ej., otro agente anti-tumor. En otros casos más aún, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente invención en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

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

En otros casos más, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir también macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (como Sepharose™ funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y agregados de lípidos (como gotitas de aceite o liposomas). Asimismo, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporcionan métodos para tratar, reducir o prevenir metástasis de tumor o invasión de tumor inhibiendo la ruta de señalización de AXL, MER o Tyro3 y/o señalización de la ruta de GAS6. En algunos casos, los métodos de la presente invención incluyen la inhibición de la actividad de AXL, MER, Tyro3 y/o GAS6, o la interacción entre AXL, MER y/o Tyro3 y GAS6. Por ejemplo, se puede inhibir la interacción de AXL, MER, Tyro3 y/o GAS6 al nivel de expresión génica, nivel de procesamiento de ARNm, nivel de traducción, nivel post-traducción, nivel de activación de proteína, etc. En otros ejemplos, se puede inhibir la actividad de AXL, MER, Tyro3 o GAS6 mediante moléculas pequeñas, moléculas biológicas, p.ej., polipéptidos, polinucleótidos, anticuerpos, conjugados de anticuerpo fármaco, etc. En otros ejemplos más, se puede inhibir la actividad de AXL, MER, Tyro3 o GAS6 mediante uno o más polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s o anticuerpos aislados de la presente invención.

En otros casos más, los métodos de la presente invención incluyen la administración a un sujeto en necesidad de tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis eficaz de una entidad terapéutica (p.ej., agente inhibidor) de la presente invención, p.ej., un inhibidor de la actividad de AXL, MER y/o Tyro3 o la actividad de GAS6 o un inhibidor de interacción entre AXL, MER y/o Tyro3 y GAS6. En algunos casos, las dosis eficaces de la entidad terapéutica de la presente invención, p.ej., para el tratamiento de cáncer metastásico, descritas en el presente documento, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, si bien es posible tratar también a mamíferos no humanos, incluyendo mamíferos transgénicos. Es necesario titular las dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia.

En algunos casos, posología puede oscilar entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg y, más habitualmente entre 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal de receptor. Por ejemplo, la posología puede consistir en 1 mg/kg peso corporal o 10 mg/kg peso corporal o se encuentra en el intervalo de 1-10 mg/kg. Un ejemplo de pauta de tratamiento entraña la administración de una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente invención se administran normalmente en varias ocasiones. Los intervalos entre cada dosis pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos pueden ser también irregulares, tal como lo indiquen las mediciones de los niveles en sangre de la entidad terapéutica en el paciente. Alternativamente, se pueden administrar las entidades terapéuticas de la presente invención como una formulación de liberación sostenida, en la que no se requiere una administración tan frecuente. La posología y la frecuencia variarán dependiendo de la semi-vida del péptido en el paciente.

En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes as lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o se pone fin a la progresión de la enfermedad y, preferentemente, hasta que el paciente presenta una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después es posible administrar un régimen profiláctico al paciente.

En otros casos, los métodos de la presente invención incluyen el tratamiento, reducción o prevención de metástasis de tumor o invasión de tumor de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de próstata y/o glioblastoma.

En otros casos más aún, las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos se administran a un paciente susceptible, o en riesgo de otro modo de padecer una enfermedad o afección en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

En otros casos más aún, para aplicaciones terapéuticas, las entidades terapéuticas de la presente invención se administran a un paciente del que se sospecha que padece dicha enfermedad o que la está padeciendo ya, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en desarrollo de la enfermedad. Una cantidad adecuada para llevar a cabo el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como dosis terapéutica o profilácticamente eficaz. En los regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, por lo general se administran agentes en varias dosis hasta conseguir una respuesta suficiente. Normalmente, se lleva un seguimiento de la respuesta y se administran varias dosis repetidas si se produce una recurrencia del cáncer.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones para el tratamiento de cáncer metastásico se pueden administrar por vía parenteral, tópica, intravenosa, intratumoral, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. La ruta de administración más típica es la intravenosa o la intratumoral si bien son igualmente eficaces otras rutas.

Para administración parental, las composiciones de la invención se pueden administrar como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril, como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Por otra parte, pueden estar presentes en la composición sustancias auxiliares como agentes de humectación o emulsificación, tensioactivos, sustancias tampón del pH, y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son derivados del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles como propilén glicol o polietilén glicol son vehículos líquidos preferentes, en particular para soluciones inyectables. Los anticuerpos y/o polipéptidos se pueden administrar en forma de una formulación de liberación prolongada o una preparación de implante que se puede formular para que permita la liberación sostenida del principio activo. Un ejemplo de composición comprende el polipéptido a 1 mg/ml, formulado en un tampón acuoso que consiste en 10 mM Tris, 210 mM de sacarosa, 51 mM L-arginina, 0,01 % polisorbato 20, ajustado a un pH 7,4 con HCl o NaOH.

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

Otras formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas se formulan por lo general como formulaciones estériles, sustancialmente isotónicas y en total conformidad con las normas de buenas prácticas de fabricación (BPF) de la Food and Drug Administration de Estados Unidos.

Preferentemente, una dosis terapéuticamente eficaz de las composiciones de anticuerpo descritas en el presente documento proporciona un beneficio terapéutico sin causar una sustancial toxicidad.

La toxicidad de las proteínas descritas en el presente documento se puede determinar a través de procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p.ej., determinando la LD₅₀ (la dosis letal del 50 % de la población) y la LD₁₀₀ (la dosis letal para un 100 % de la población). La relación entre el efecto tóxico y terapéutico de la dosis es el índice terapéutico. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden utilizarse en la formulación de un intervalo de dosificación que no sea tóxico para uso humano. La dosis de las proteínas descritas en el presente documento se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la dosis eficaz con una escasa toxicidad o ninguna en absoluto. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosis empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación, la ruta de administración y la posología exacta pueden seleccionarla un médico en concreto a la vista del estado del paciente. (Véase, p.ej., Fingl et al., 1975, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1).

Entran dentro del alcance de la presente divulgación kits que comprenden las composiciones (p.ej., los polipéptidos variantes de AXL, MER o Tyro3s y formulaciones de los mismos) de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional. Los kits incluyen normalmente una etiqueta que indica el uso del contenido del kit pretendido. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o registrado suministrado con el kit, o que acompaña de otro modo al kit.

De acuerdo con otro aspecto más de la divulgación, se proporcionan métodos para determinar la capacidad de un tumor de producir invasión de tumor y/o metástasis detectando y/o determinando el nivel de actividad de AXL, MER y/o Tyro3 o actividad de GAS6 en una muestra biológica de un sujeto de interés. En una realización, el nivel de actividad de AXL, MER y/o Tyro3 o actividad de GAS6 se mide según el nivel de expresión de ARNm, el nivel de expresión de proteína, el nivel de activación de proteína o cualquier indicador adecuado que corresponde a la actividad de AXL, MER y/o Tyro3 o GAS6 directa o indirectamente. En algunos casos, el nivel de actividad de AXL, MER y/o Tyro3 o actividad de GAS6 en una muestra biológica se compara además con un nivel predeterminado, p.ej., un nivel normal obtenido al establecer niveles o intervalos normales de actividad de AXL, MER y/o Tyro3 o actividad de GAS6 sobre la base de una población de muestras de tumores que no han desarrollado invasión de tumor o metástasis de tumor o de tejidos normales. Por ejemplo, una mayor actividad de AXL, MER y/o Tyro3 o actividad de GAS6 con respecto al nivel predeterminado o el nivel normal es indicativa de una predisposición del tumor a pasar a invasión de tumor o metástasis de tumor.

PARTE EXPERIMENTAL

EJEMPLO 1 – AFINIDADES DE VARIAS CONSTRUCCIONES AXL FC

La Figura 1 presenta cuatro dominios de AXL y varias combinaciones de construcciones de AXL Fc preparadas y analizadas.

Se prepararon las siguientes construcciones de AXL Fc:

- Fusión Fc de tipo silvestre de longitud completa
- Fusión Fc péptido AXL 1 de longitud completa
- Fusión Fc péptido AXL 1 Fn(-) (es la construcción Fn)
- Fusión Fc péptido AXL 1 de longitud completa con sitio de unión GAS6 menor desactivado
- Fusión Fc péptido AXL 1 Fn(-), enlazador 3x gly4ser entre Fc y AXL
- Fusión Fc péptido AXL 1 Fn(-), enlazador 5x gly4ser entre Fc y AXL
- Fusión Fc péptido AXL 1 A72V Fn(-), enlazador 3x gly4ser entre Fc y AXL

En la Tabla 1, a continuación, se indican las afinidades de las construcciones mencionadas con GAS6, con AXL de tipo silvestre con fines comparativos.

Tabla 1: Afinidades de construcción

Clon AXL	Dominios Fn	Fc	Enlazador	Kd (pM)
Tipo silvestre Ig1	-	Ninguno	Ninguno	32,8 ± 0,63
Péptido AXL 1 Ig1	-	Ninguno	Ninguno	2,7 ± 0,05
(a) Tipo silvestre	+	hIgG	Ninguno	9,2 ± 0,17
(b) Péptido AXL 1	+	hIgG	Ninguno	0,4 ± 0,01
(c) Péptido AXL 1	-	hIgG	Ninguno	2,6 ± 0,05
(d) Péptido AXL 1 (-) sitio menor	+	hIgG	Ninguno	2,6 ± 0,10
(e) Péptido AXL 1	-	hIgG	3x gly4ser	1,2 ± 0,03
(f) Péptido AXL 1	-	hIgG	5x gly4ser	1,2 ± 0,03
(g) Péptido AXL 1 A72V	-	hIgG	3x gly4ser	0,3 ± 0,00

Se pueden extraer varias conclusiones de los datos expuestos en la Tabla 1.

Las construcciones de fusión Fc proporcionan potenciamentos de la afinidad con respecto a las formas monoméricas. Por ejemplo: AXL de tipo silvestre Ig1 (monomérico) tiene una afinidad de ~33 pM, mientras que la fusión Fc tipo silvestre tiene una afinidad de ~9 pM y el péptido AXL 1 Ig1 (monomérico) tiene una afinidad de ~3 pM, mientras que el péptido AXL 1- fusión Fc tiene una afinidad de ~0,4 pM.

Mejoras de afinidad significativas para el péptido AXL 1 con respecto a AXL de tipo silvestre. Por otra parte, el péptido AXL 1 más la mutación A72V tiene una mayor potenciación de la afinidad, la construcción (e) en comparación con la construcción (g), con respecto al tipo de AX silvestre.

El mecanismo de aumento de la afinidad en la fusión Fc proviene de la unión multivalente de una sola molécula de GAS6. Concretamente, un brazo de la fusión se une con el sitio de unión de AXL mayor mientras que el otro se une al menor. La conclusión se basó en los siguientes datos experimentales.

- 5 a. El péptido AXL 1 Ig1 (monómero) tiene la misma afinidad que el péptido AXL 1 Fn(-) Fusión FC, (c) en la tabla anterior. Esto indica que simplemente con dos copias de AXL no es suficiente para proporcionar una mejora en la afinidad.
- 10 b. El péptido AXL 1 de longitud completa con el sitio de unión menor eliminado tiene la misma afinidad que el monómero y la fusión Fn(-). Esto demuestra que el sitio de unión menor tiene un papel definitivo en la mejora de la afinidad.
- 15 c. Las construcciones Fn(-) están dispuestas de tal forma que el sitio de unión menor es inaccesible para la molécula de GAS6 grande. La adición de enlazadores entre AXL y el Fc proporciona una flexibilidad y espacio adicionales y, con ello, se obtiene el doble de mejora en afinidad. Esto corrobora la idea de que el sitio de unión menor es importante.

En términos globales, el ejemplo 1 demuestra que las fusiones Fc de AXL EDC pueden tener una mejor afinidad con GAS6 en comparación con AXL de tipo silvestre. Sin pretender vincularse a teoría alguna, un mecanismo que subyace bajo esta mejor afinidad es la unión simultánea de un brazo de la construcción con el sitio de unión de AXL mayor en GAS6 y el otro al sitio de unión de AXL menor en GAS6.

20 EJEMPLO 2 –AFINIDADES DE VARIAS CONSTRUCCIONES AXL FC

Secuencia: Péptido AXL 2 - Fc. El Péptido AXL 2 incluye los aminoácidos 1-131 de AXL, tiene el dominio Ig2 suprimido y tiene ambos dominios FN suprimidos.

25 Esta construcción incluye los aminoácidos 1 - 131 de AXL fusionados con IgG1 humana con un solo enlazador Gly4Ser que conecta los dos dominios (véase Figure 2). Adicionalmente, las construcciones pueden incluir varias mutaciones de la porción AXL de la molécula, tal como se describe en la presente invención. Por ejemplo, ciertas realizaciones pueden incluir tener la fusión Fc péptido AXL 1 Ig1 o péptido AXL 1 más A72V.

30 Según la medición, la afinidad del péptido AXL 1 Ig1- Fc con GAS6 humana es 1,7 +/- 0,03 pM.

En términos globales, el ejemplo 2 demuestra que las fusiones Fc de AXL dominio Ig2 puede mejorar la afinidad a GAS6 en comparación con AXL de tipo silvestre.

35 La invención que se ha expuesto ha sido descrita con detalle a modo de ilustración y con ejemplos con el fin de aclarar su comprensión.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Giaccia, Amato J.
Rankin, Erinn Bruno
Cochran, Jennifer R.
Jones, Douglas
45 Kariolis, Mihalios
Fuh, Katherine
Miao, Yu
Hershenson, Susan

50 <120> PÉPTIDOS DE AXL MODIFICADOS Y SU USO EN LA INHIBICIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE AXL EN TERAPIA ANTI-METASTÁSICA

<130> STAN-1005WO

55 <150> 61/737.276

<151> 12-12-2012

<160> 10

60 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 894

<212> PRT

65 <213> *H. sapiens*

<400> 1

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

His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	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				
Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro
805						810					815				
Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Val	Asn	Met	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Pro	Glu
820						825					830				
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Gln	Pro	Asp	Pro
835						840					845				
Lys	Asp	Ser	Cys	Ser	Cys	Leu	Thr	Ala	Ala	Glu	Val	His	Pro	Ala	Gly
850						855					860				
Arg	Tyr	Val	Leu	Cys	Pro	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala
865						870					875				
Asp	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Asp	Gly	Ala		
885						890									

```
<210> 2
<211> 999
<212> PRT
<213> H. sapiens
<400> 2
```

5

Met 1	Gly	Pro	Ala	Pro 5	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu 10	Gly	Leu	Phe	Leu	Pro 15	Ala
Leu	Trp	Arg	Arg	Ala 20	Ile	Thr	Glu	Ala 25	Arg	Glu	Glu	Ala	Lys 30	Pro	Tyr
Pro	Leu	Phe 35	Pro	Gly	Pro	Phe 40	Pro	Gly	Ser	Leu	Gln	Thr 45	Asp	His	Thr
Pro	Leu 50	Leu	Ser	Leu	Pro	His 55	Ala	Ser	Gly	Tyr	Gln 60	Pro	Ala	Leu	Met
Phe 65	Ser	Pro	Thr	Gln 70	Pro	Gly	Arg	Pro	His 75	Thr	Gly	Asn	Val	Ala	Ile 80
Pro	Gln	Val	Thr	Ser 85	Val	Glu	Ser	Lys 90	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu 95	Ala	Phe
Lys	His	Thr 100	Val	Gly	His	Ile	Ile 105	Leu	Ser	Glu	His	Lys	Gly 110	Val	Lys
Phe	Asn	Cys 115	Ser	Ile	Ser	Val	Pro 120	Asn	Ile	Tyr	Gln	Asp 125	Thr	Thr	Ile
Ser	Trp 130	Trp	Lys	Asp	Gly	Lys 135	Glu	Leu	Leu	Gly	Ala 140	His	His	Ala	Ile
Thr 145	Gln	Phe	Tyr	Pro	Asp 150	Asp	Glu	Val	Thr	Ala 155	Ile	Ile	Ala	Ser	Phe 160
Ser	Ile	Thr	Ser	Val 165	Gln	Arg	Ser	Asp	Asn 170	Gly	Ser	Tyr	Ile	Cys 175	Lys
Met	Lys	Ile 180	Asn	Asn	Glu	Glu	Ile 185	Val	Ser	Asp	Pro	Ile	Tyr 190	Ile	Glu
Val	Gln	Gly 195	Leu	Pro	His	Phe 200	Thr	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser 205	Met	Asn	Val
Thr 210	Arg	Asn	Thr	Ala	Phe 215	Asn	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala 220	Val	Gly	Pro	Pro
Glu 225	Pro	Val	Asn	Ile 230	Phe	Trp	Val	Gln	Asn 235	Ser	Ser	Arg	Val	Asn	Glu 240
Gln	Pro	Glu	Lys	Ser 245	Pro	Ser	Val	Leu	Thr 250	Val	Pro	Gly	Leu	Thr 255	Glu
Met	Ala	Val 260	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His 265	Asn	Asp	Lys	Gly	Leu 270	Thr	Val
Ser	Lys	Gly 275	Val	Gln	Ile	Asn	Ile 280	Lys	Ala	Ile	Pro	Ser	Pro 285	Pro	Thr
Glu	Val 290	Ser	Ile	Arg	Asn	Ser 295	Thr	Ala	His	Ser	Ile 300	Leu	Ile	Ser	Trp

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

				805					810					815			
His	Arg	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Asp	Cys	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr	Glu	Ile		
			820					825					830				
Met	Tyr	Ser	Cys	Trp	Arg	Thr	Asp	Pro	Leu	Asp	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser		
		835					840					845					
Val	Leu	Arg	Leu	Gln	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Pro	Asp	Val		
	850					855				860							
Arg	Asn	Gln	Ala	Asp	Val	Ile	Tyr	Val	Asn	Thr	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser		
865					870				875						880		
Ser	Glu	Gly	Leu	Ala	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Pro	Leu	Asp	Leu	Asn		
			885						890					895			
Ile	Asp	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile	Ala	Ser	Cys	Thr	Pro	Arg	Ala	Ala	Ile		
		900						905					910				
Ser	Val	Val	Thr	Ala	Glu	Val	His	Asp	Ser	Lys	Pro	His	Glu	Gly	Arg		
	915						920					925					
Tyr	Ile	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Glu	Glu	Trp	Glu	Asp	Leu	Thr	Ser	Ala		
	930				935					940							
Pro	Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Glu	Lys	Asn	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Glu		
945					950				955						960		
Arg	Leu	Val	Arg	Asn	Gly	Val	Ser	Trp	Ser	His	Ser	Ser	Met	Leu	Pro		
			965						970					975			
Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Pro	Asp	Glu	Leu	Leu	Phe	Ala	Asp	Asp	Ser	Ser		
		980						985					990				
Glu	Gly	Ser	Glu	Val	Leu	Met											
		995															

<210> 3
 <211> 890
 <212> PRT
 <213> *H. sapiens*

<400> 3

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

Ala	Ser	Val	Ala	Trp	Met	Pro	Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Ala	Leu	Leu	Gln
			245						250					255	
Ser	Cys	Thr	Val	Gln	Val	Thr	Gln	Ala	Pro	Gly	Gly	Trp	Glu	Val	Leu
			260					265					270		
Ala	Val	Val	Val	Pro	Val	Pro	Pro	Phe	Thr	Cys	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu
			275				280					285			
Val	Pro	Ala	Thr	Asn	Tyr	Ser	Leu	Arg	Val	Arg	Cys	Ala	Asn	Ala	Leu
			290			295					300				
Gly	Pro	Ser	Pro	Tyr	Ala	Asp	Trp	Val	Pro	Phe	Gln	Thr	Lys	Gly	Leu
305					310					315					320
Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Gln	Asn	Leu	His	Ala	Ile	Arg	Thr	Asp	Ser
				325					330					335	
Gly	Leu	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Glu	Val	Ile	Pro	Glu	Ala	Pro	Leu	Glu
			340					345					350		
Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Tyr	Lys	Leu	Ser	Trp	Val	Gln	Asp	Asn	Gly	Thr
			355				360					365			
Gln	Asp	Glu	Leu	Thr	Val	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Asn	Leu	Thr	Gly	Trp
			370			375					380				
Asp	Pro	Gln	Lys	Asp	Leu	Ile	Val	Arg	Val	Cys	Val	Ser	Asn	Ala	Val
385					390					395					400
Gly	Cys	Gly	Pro	Trp	Ser	Gln	Pro	Leu	Val	Val	Ser	Ser	His	Asp	Arg
				405					410					415	
Ala	Gly	Gln	Gln	Gly	Pro	Pro	His	Ser	Arg	Thr	Ser	Trp	Val	Pro	Val
			420					425					430		
Val	Leu	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu
			435				440					445			
Ile	Leu	Leu	Arg	Lys	Arg	Arg	Lys	Glu	Thr	Arg	Phe	Gly	Gln	Ala	Phe
	450				455						460				
Asp	Ser	Val	Met	Ala	Arg	Gly	Glu	Pro	Ala	Val	His	Phe	Arg	Ala	Ala
465					470					475					480
Arg	Ser	Phe	Asn	Arg	Glu	Arg	Pro	Glu	Arg	Ile	Glu	Ala	Thr	Leu	Asp
			485					490						495	
Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Asp	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Glu	Asp	Val	Leu
			500					505					510		
Ile	Pro	Glu	Gln	Gln	Phe	Thr	Leu	Gly	Arg	Met	Leu	Gly	Lys	Gly	Glu
		515					520					525			
Phe	Gly	Ser	Val	Arg	Glu	Ala	Gln	Leu	Lys	Gln	Glu	Asp	Gly	Ser	Phe
	530					535					540				
Val	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Ala	Asp	Ile	Ile	Ala	Ser	Ser
545					550					555					560
Asp	Ile	Glu	Glu	Phe	Leu	Arg	Glu	Ala	Ala	Cys	Met	Lys	Glu	Phe	Asp
				565				570						575	
His	Pro	His	Val	Ala	Lys	Leu	Val	Gly	Val	Ser	Leu	Arg	Ser	Arg	Ala
			580					585					590		
Lys	Gly	Arg	Leu	Pro	Ile	Pro	Met	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys	His
		595					600					605			
Gly	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Arg	Ile	Gly	Glu	Asn	Pro
	610					615					620				
Phe	Asn	Leu	Pro	Leu	Gln	Thr	Leu	Ile	Arg	Phe	Met	Val	Asp	Ile	Ala
625					630					635					640
Cys	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ser	Ser	Arg	Asn	Phe	Ile	His	Arg	Asp	Leu
				645					650					655	
Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Ala	Glu	Asp	Met	Thr	Val	Cys	Val	Ala
			660					665					670		
Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Lys	Ile	Tyr	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Gln
		675					680					685			
Gly	Cys	Ala	Ser	Lys	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Leu	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu
	690					695					700				
Ala	Asp	Asn	Leu	Tyr	Thr	Val	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ala	Phe	Gly	Val
705					710						715				720
Thr	Met	Trp	Glu	Ile	Met	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Ala	Gly	Ile
				725					730					735	
Glu	Asn	Ala	Glu	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Gly	Asn	Arg	Leu	Lys

			740					745					750				
	Gln	Pro	Pro	Glu	Cys	Met	Glu	Asp	Val	Tyr	Asp	Leu	Met	Tyr	Gln	Cys	
			755					760					765				
	Trp	Ser	Ala	Asp	Pro	Lys	Gln	Arg	Pro	Ser	Phe	Thr	Cys	Leu	Arg	Met	
		770					775					780					
	Glu	Leu	Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Gln	
	785					790					795					800	
	Asp	Pro	Leu	Tyr	Ile	Asn	Ile	Glu	Arg	Ala	Glu	Glu	Pro	Thr	Ala	Gly	
					805					810					815		
	Gly	Ser	Leu	Glu	Leu	Pro	Gly	Arg	Asp	Gln	Pro	Tyr	Ser	Gly	Ala	Gly	
				820					825					830			
	Asp	Gly	Ser	Gly	Met	Gly	Ala	Val	Gly	Gly	Thr	Pro	Ser	Asp	Cys	Arg	
		835						840					845				
	Tyr	Ile	Leu	Thr	Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Pro	Gly	Gln	Ala	Glu	
		850				855						860					
	His	Gln	Pro	Glu	Ser	Pro	Leu	Asn	Glu	Thr	Gln	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	
	865					870					875					880	
	Gln	Gln	Gly	Leu	Leu	Pro	His	Ser	Ser	Cys							
				885					890								

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *H. sapiens*

<400> 4

	Leu	Arg	Met	Phe	Ser	Gly	Thr	Pro	Val	Ile	Arg	Leu	Arg	Phe	Lys	Arg
	1				5					10					15	
	Leu	Gln	Pro	Thr												
				20												

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *H. sapiens*

<400> 5

	Glu	Val	Gly	Arg	Val	Thr	Ser	Ser	Gly	Pro
	1				5					10

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *H. sapiens*

<400> 6

	Arg	Asn	Leu	Val	Ile	Lys	Val	Asn
	1				5			

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *H. sapiens*

<400> 7

Asp Ala Val Met Lys Ile Ala Val Ala
1 5

5
<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> *H. sapiens*
<400> 8

10
Glu Arg Gly Leu Tyr His Leu Asn Leu Thr Val Gly Ile Pro Phe His
1 5 10 15

15
<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> *H. sapiens*
<400> 9

20
Trp Leu Asn Gly Glu Asp Thr Thr Ile Gln Glu Thr Val Val Asn Arg
1 5 10 15
Met

25
<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> Enlazador sintético
30
<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de GAS6, en donde el inhibidor es un polipéptido variante de AXL soluble, en donde dicho polipéptido variante de AXL soluble:

- 5 es una proteína de fusión;
 carece del dominio de transmembrana de AXL;
 carece de un dominio de fibronectina funcional (FN),
 tiene uno o más de un dominio Ig1 y, opcionalmente, uno o más de un dominio Ig2;
10 comprende un conjunto de sustituciones de aminoácido en las posiciones, en relación con los aminoácidos 8-894
 del SEQ ID NO:1: G32, A72, D87, V92 y G127; o en las posiciones G32, D87, V92 y G127; en donde el
 polipéptido variante de AXL soluble comprende un conjunto de sustituciones de aminoácido seleccionadas de
 entre Gly32Ser, Asp87Gly, Val92Ala y Gly127Arg; y Gly32Ser, Ala72Val, Asp87Gly, Val92Ala y Gly127Arg;
15 comprende un dominio Fc unido al polipéptido variante de AXL soluble mediante un enlazador que comprende
 una o más unidades (GLY)₄SER (SEQ ID NO:10); y
 presenta una mayor afinidad de unión a GAS6 en comparación con AXL de tipo silvestre (SEQ ID NO:1).

2. El inhibidor de la reivindicación 1, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 3. El inhibidor de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, para su uso en un método de tratamiento en un paciente
 mamífero de un tumor, para reducir el crecimiento o la metástasis del tumor.

Figura 1

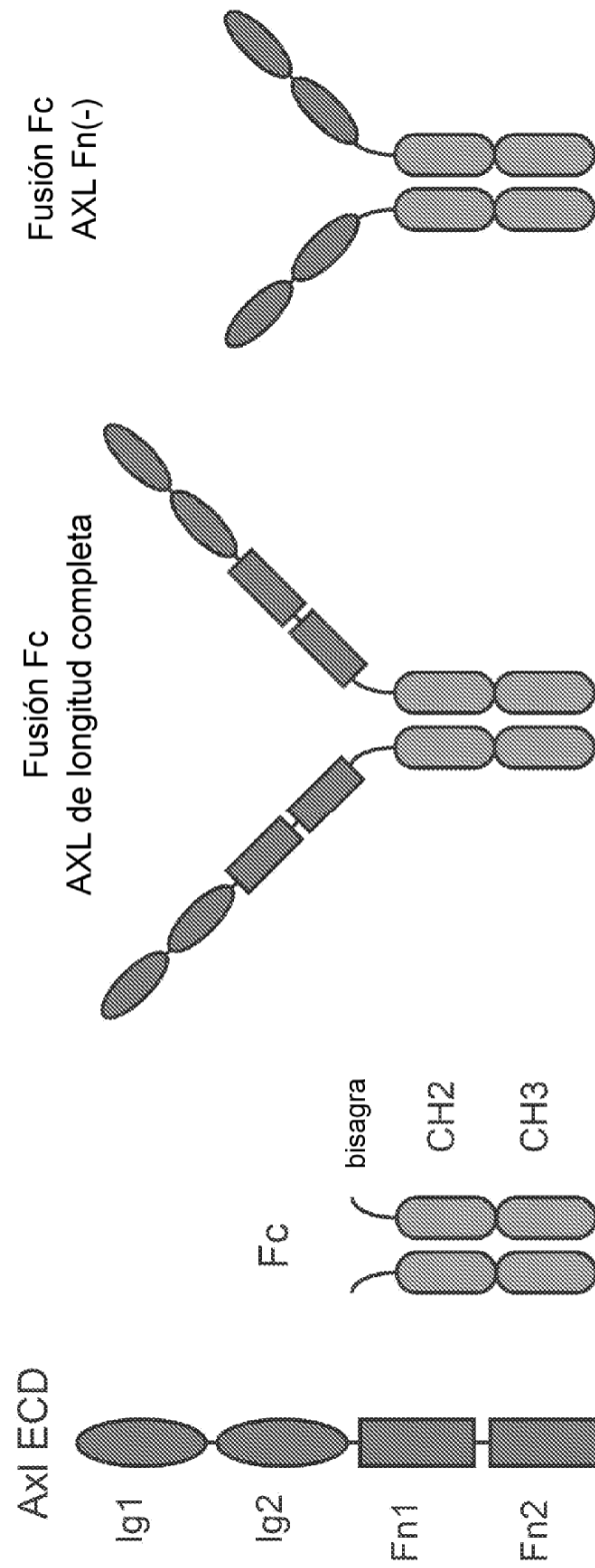


Figura 2

