

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 214**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08850452 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2220121**

54 Título: **Anticuerpos para AXL**

30 Prioridad:

12.11.2007 EP 07021931

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

14.01.2016

73 Titular/es:

**U3 PHARMA GMBH (100.0%)
FRAUNHOFERSTRASSE 22
82152 MARTINSRIED, DE**

72 Inventor/es:

**HETTMANN, THORE;
NIEWÖHNER, JENS;
RUHE, JENS;
WIRTZ, PETER;
SELLE, KERSTIN;
ZWICK-WALLASCH, ESTHER y
ROTHE, MIKE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 556 214 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para AXL.

La presente invención se refiere a anticuerpos, particularmente a anticuerpos monoclonales, que se unen al dominio extracelular de la tirosina cinasa receptora AXL y que inhiben al menos parcialmente la actividad de AXL.

5 **Antecedentes**

La tirosina cinasa receptora AXL (Ark, UFO, Tyro-7) es un miembro de la familia Tyro-3 de cinasas, siendo los otros miembros Mer (Eyk, Nyk, Tyro-12) y Sky (Rse, Tyro-3, Dtk, Etk, Brt, Tif). Se activa mediante la unión del ligando heterófilo Gas6, una proteína de 70 kDa homologa a la proteína S del factor anticoagulante. En contraste con otras tirosina cinasas receptoras, la fosforilación de tirosina AXL también se puede inducir mediante unión homófila. La activación de AXL conduce a la señalización a través de PI-3-cinasa/Akt (Franke y cols., Oncogene 22: 8983-8998, 2003) y otras rutas principales como Ras/Erk y β -catenina/TCF (Goruppi y cols., Mol. Cell Biol. 21: 902-915, 2001).

La AXL se expresa débilmente en una gama de tejidos normales, incluyendo el cerebro, el corazón, el músculo esquelético, las cápsulas de los órganos y el tejido conectivo de varios otros órganos, y en monocitos, pero no linfocitos. La fosforilación de Akt inducida por AXL se ha descrito en la supervivencia de fibroblastos (Goruppi y cols., Mol Cell Biol 17: 4442-4453 1997), células endoteliales (Hasanbasic y cols., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004), células del músculo liso vascular (Melaragno y cols., J. Mol. Cell Cardiol. 37: 881-887, 2004) y neuronas (Allen y cols., Mol. Endocrinol. 13: 191-201 1999). Por otra parte, la AXL representa un papel en la adhesión celular y la quimiotaxis. Los animales con AXL desactivada presentan estabilización de los agregados plaquetarios deteriorada y formación de trombos como resultado de la activación reducida de la integrina plaquetaria IIb3.

La sobreexpresión de AXL se ha demostrado en diversos tipos de cáncer, p. ej. carcinoma de mama (Merik y cols., Clin. Cancer Res. 8: 361-367, 2002; Berclaz y cols., Ann. Oncol. 12: 819-824, 2001), colon (Chen y cols., Int. J. Cancer 83: 579-584, 1999; Craven y cols., Int. J. Cancer 60: 791-797, 1995), próstata (Jacob y cols., Cancer Detect. Prev. 23: 325-332, 1999), pulmón (Wimmel y cols., Eur J Cancer 37: 2264-2274, 2001), gástrico (Wu y cols., Anticancer Res 22: 1071-1078, 2002), ovárico (Sun y cols., Oncology 66: 450-457, 2004), endometrial (Sun y cols., Ann. Oncol. 14: 898-906, 2003), renal (Chung y cols., DNA Cell Biol. 22: 533-540, 2003), hepatocelular (Tsou y cols., Genomics 50:331-340, 1998), tiroideo (Ito y cols., Thyroid 12:971-975, 2002; Ito y cols., Thyroid 9: 563-567, 1999) y esofágico (Nemoto y cols., 1997), también en CML (Janssen y cols., A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. Oncogene, 6: 2113-2120, 1991; Braunger y cols., Oncogene 14:2619-2631 1997; O'Bryan y cols., Mol Cell Biol 11:5016-5031,1991), AML (Rochlitz y cols., Leukemia 13: 1352-1358, 1999), osteosarcoma (Nakano y cols., J. Biol. Chem. 270:5702-5705, 2003), melanoma (van Ginkel y cols., Cancer Res 64:128-134, 2004) y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Green y cols., Br J Cancer. 2006 94:1446-5, 2006). La Patente de EE. UU. 5.468.634 divulga secuencias de DNA aisladas que codifican un receptor AXL de mamífero que exhibe actividad del oncogén AXL.

Por otra parte, la AXL se ha identificado como un gen asociado a metástasis que es regulado al alza en líneas celulares de cáncer de mama agresivo en comparación con células no invasivas. In vitro, se encontró que se requería la actividad de AXL para la migración y la invasión, y esta actividad se podría inhibir mediante el tratamiento con anticuerpos (WO04008147). El documento EP 1382969 divulga un método para determinar la invasividad de trastornos malignos. El documento US 2007/065444 se refiere a un método para evaluar un compuesto para el uso en un tratamiento. De forma similar, la anulación de la actividad de AXL in vivo, bien a través de la expresión de una versión negativa dominante de AXL (Vajkoczy, P., y cols., Proc. Natl. Acad. Science U.S.A. 103: 5799-5804. 2005) o bien mediante regulación a la baja de AXL mediada por siRNA (Holland y cols., Cancer Res. 65: 9294-9303, 2005), evitaba el crecimiento celular subcutáneo y ortotópico en experimentos con xenoinjertos en murinos.

Hasta ahora se han descritos dos anticuerpos que se unen a AXL y poseen actividad biológica. "AXL (Z49M): Sc-73715" es un anticuerpo monoclonal producido contra el dominio extracelular de AXL de origen humano. Un anticuerpo es capaz de reducir la invasión celular mediada por AXL (documento WO04008147) mientras que se ha presentado que el otro reduce la interacción AXL/ligando. Sin embargo, ambos anticuerpos son policlonales, lo que los hace inadecuados para la administración terapéutica.

Así, a la luz del potencial terapéutico de AXL, hay una gran necesidad de anticuerpos monoclonales para AXL, fragmentos de anticuerpo o derivados de los mismos que bloqueen eficazmente y específicamente la transducción de señales mediada por AXL y que sean adecuados para un tratamiento terapéutico.

Según un primer aspecto de la presente invención, se refiere a un anticuerpo monoclonal como el definido en las reivindicaciones que se une a un dominio extracelular de AXL, particularmente de AXL humana, e inhibe al menos parcialmente la actividad de AXL.

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención posee además al menos una o más de las siguientes propiedades: la capacidad para reducir o bloquear la transducción de señales mediada por AXL, la capacidad para reducir o bloquear la fosforilación de AXL, la capacidad para reducir o bloquear la proliferación celular, la capacidad para reducir o bloquear la angiogénesis, la capacidad para reducir o bloquear la migración celular, la capacidad para

reducir o bloquear la metástasis tumoral, la capacidad para reducir o bloquear la señalización de PI3K mediada por AXL y la capacidad para reducir o bloquear la antiapoptosis mediada por AXL, incrementando de ese modo, por ejemplo, la sensibilidad de una célula frente al tratamiento con un agente antineoplásico. Por otra parte, los anticuerpos de la presente invención pueden exhibir una gran especificidad para AXL, particularmente AXL humana, y no reconocen significativamente otros miembros de la familia Tyro-3, p. ej. MER y/o SKY y/o AXL de mamífero no primate, tal como AXL murina. La especificidad de los anticuerpos se puede determinar mediante medidas de la reactividad cruzada como las descritas en los Ejemplos.

El término "actividad" se refiere a la función biológica de AXL, que influye en el fenotipo de una célula, en particular, pero no limitado a, fenotipos de cáncer tales como evasión de la apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, proliferación celular, invasión de tejidos y/o metástasis, insensibilidad a las señales anticrecimiento (antiapoptosis) y/o angiogénesis sostenida.

El término "transducción de señales mediada por AXL" significa la activación de rutas del segundo mensajero desencadenadas por la interacción directa o indirecta de AXL con moléculas del segundo mensajero.

El término "fosforilación de AXL" se refiere a la fosforilación de residuos de aminoácido, preferiblemente residuos de tirosina, bien mediante una segunda proteína de AXL (transfosforilación) o mediante otra proteína que tenga actividad de proteína cinasa.

El término "proliferación celular" se refiere a todos los procesos que implican AXL subyacentes a la reproducción de células humanas, en particular, pero no limitadas a, células cancerosas humanas. Contribuyen a o dan como resultado la replicación de DNA celular, la separación del DNA duplicado en dos grupos de igual tamaño de cromosomas, y la división física (llamada citoquinesis) de células, y estarán estimulados o mediados por actividades de AXL no catalíticas o catalíticas, incluyendo preferiblemente la fosforilación de AXL y/o la transducción de señales mediada por AXL.

El término "angiogénesis" se refiere a todos los procesos que implican AXL que contribuyen al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, en particular, pero no limitados a, nuevos vasos sanguíneos que irrigan tumores. Estos procesos incluyen múltiples episodios celulares tales como proliferación, supervivencia, migración y ramificación de células endoteliales vasculares, atracción y migración de pericitos así como formación de la membrana basal para la estabilización de vasos, perfusión de vasos o secreción de factores angiogénicos por células estromales o neoplásticas, y estarán estimulados o mediados por actividades de AXL no catalíticas o catalíticas, incluyendo preferiblemente fosforilación de AXL y/o transducción de señales mediada por AXL.

El término "metástasis" se refiere a todos los procesos que implican AXL que ayudan a las células cancerosas a dispersarse desde un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y/o sanguíneos, circular a través de la corriente sanguínea y crecer en un foco alejado (metástasis) en tejidos normales de cualquier parte del cuerpo. En particular, se refiere a episodios celulares de células tumorales tales como proliferación, migración, independencia de anclaje, evasión de la apoptosis, o secreción de factores angiogénicos, que subyacen a la metástasis y son estimulados o mediados por actividades de AXL no catalíticas o catalíticas, incluyendo preferiblemente fosforilación de AXL y/o transducción de señales mediada por AXL.

El término "apoptosis mediada por AXL" se refiere a todos los procesos que implican AXL que evitan que células humanas, preferiblemente, pero no limitadas a, células cancerosas, sufran muerte celular programada (apoptosis). En particular, se refiere a procesos que evitan que células humanas, preferiblemente, pero no limitadas a, células cancerosas humanas, sufran inducción de la apoptosis a través de retirada de factores de crecimiento, hipoxia, exposición a agentes quimioterapéuticos o radiación, o inicio de la señalización mediada por receptor de Fas/Apo-1, y están estimulados o mediados por actividades de AXL no catalíticas o catalíticas, incluyendo preferiblemente fosforilación de AXL y/o transducción de señales mediada por AXL.

Además, la presente invención incluye anticuerpos cuyas actividades de unión a AXL son $KD = 10^{-5}$ M o menos, preferiblemente $KD = 10^{-7}$ M o menos, y lo más preferiblemente $KD = 10^{-9}$ M o menos. Que la actividad de unión de un anticuerpo de la presente invención a AXL sea $KD = 10^{-5}$ M o menos se puede determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la especialidad. Por ejemplo, la actividad se puede determinar usando resonancia de plasmones superficiales con Biacore, y/o mediante ELISA (ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas), EIA (inmunoensayos enzimáticos), RIA (radioinmunoensayos) o técnicas de anticuerpos fluorescentes, p. ej. FACS.

En un segundo aspecto, el anticuerpo puede tener al menos un sitio de unión a antígeno, p. ej. uno o dos sitios de unión a antígeno. Además, el anticuerpo comprende al menos una cadena de inmunoglobulina pesada y al menos una cadena de inmunoglobulina ligera. Una cadena de inmunoglobulina comprende un dominio variable y opcionalmente un dominio constante. Un dominio variable comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), una región CDR1, CDR2 y CDR3, y regiones marco. El término "región determinante de la complementariedad" (CDR) está bien definido en la especialidad (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbour, 1988) y se refiere a los tramos de aminoácidos dentro de la región variable de un anticuerpo que entran en contacto ante todo con el antígeno.

Un anticuerpo de la invención que se une al dominio extracelular de AXL comprende al menos una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende las CDR seleccionadas

(a) CDRH1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 16,

(b) CDRH2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 17 y

5 (c) CDRH3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 18

y al menos:

una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende las CDR

(d) CDRL1 como la mostrada en las SEQ ID N°: 13,

(e) CDRL2 como la mostrada en las SEQ ID N°: 14 y

10 (f) CDRL3 como la mostrada en las SEQ ID N°: 15.

En otra realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 8 o al menos el dominio variable de la misma y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID N°: 7 o al menos el dominio variable de la misma.

15 Según se usa en la presente memoria, "identidad de secuencia" entre dos secuencias polipeptídicas indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. Las secuencias polipeptídicas preferidas de la invención tienen una identidad de secuencia de al menos 90%.

En una realización preferida particular, el anticuerpo es 11 B7.

20 El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo de origen natural y/o sintético, p. ej. un anticuerpo de origen de mamífero. Preferiblemente, el dominio constante – si está presente – es un dominio constante humano. El dominio variable es preferiblemente un dominio variable de mamífero, p. ej. un dominio variable humanizado o humano. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

25 El anticuerpo de la invención puede ser del tipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, preferiblemente del tipo IgG o IgM, incluyendo, pero no limitado al, tipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1 e IgM2. En las realizaciones más preferidas, el anticuerpo es del tipo IgG1, IgG2 o IgG4 humana.

30 Como se analiza anteriormente, existe un número de isotipos de anticuerpos. Se apreciará que los anticuerpos cuando se generan no necesitan poseer inicialmente tal isotipo sino que, en cambio, el anticuerpo cuando se genera puede poseer un isotipo y que el anticuerpo puede cambiarse de isotipo usando los genes de la región V molecularmente clonados o genes de la región constante clonados o cDNA en vectores de expresión apropiados usando técnicas de biología molecular convencionales que son muy conocidas en la especialidad y a continuación expresando los anticuerpos en células huésped usando técnicas conocidas en la especialidad.

35 Dentro del contexto de la presente invención, el término "proteína de andamiaje", según se usa en la presente memoria, significa un polipéptido o una proteína con superficies expuestas en las que son altamente tolerables inserciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos. Ejemplos de proteínas de andamiaje que se pueden usar según la presente invención son proteína A de *Staphylococcus aureus*, la proteína de unión a bilina de *Pieris brassicae* u otras lipocalinas, proteínas de repetición de anquirina y fibronectina humana (revisado en Binz y Pluckthun, *Curr Opin Biotechnol*, 16: 459-69, 2005). La manipulación de una proteína de andamiaje se puede considerar injertar o integrar una función de afinidad en el marco estructural de una proteína plegada establemente. Función de afinidad significa una afinidad de unión a proteína según la presente invención. Un andamiaje puede ser 40 estructuralmente separable de las secuencias de aminoácidos que confieren especificidad de unión. En general, proteínas que parecen adecuadas para el desarrollo de tales reactivos de afinidad artificiales se pueden obtener mediante técnicas de manipulación de proteínas racionales o, lo más comúnmente, combinatorias tales como barrido contra AXL, bien proteína purificada o bien proteína presentada sobre la superficie celular, para unirse a agentes de una biblioteca de andamiajes artificiales presentada in vitro, habilidades que se conocen en la técnica (Skerra, *J. Mol. Recog.*, *Biochim Biophys Acta*, 1482: 337-350, 2000; Binz y Plückthun, *Curr Opin Biotechnol*, 16: 459-69, 2005). Además, una proteína de andamiaje que tiene un anticuerpo como actividad de unión se puede derivar de un polipéptido aceptor que contiene el dominio de andamiaje, que puede estar injertado con dominios de unión de un polipéptido donante que confiere la especificidad de unión del polipéptido donante al dominio de andamiaje que contiene el polipéptido aceptor. Los dominios de unión insertados pueden incluir, por ejemplo, al 45 menos una CDR de un anticuerpo anti-AXL, preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo de las SEQ ID N°: 13-30. La inserción se puede efectuar mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la especialidad incluyendo, por ejemplo, síntesis de polipéptidos, síntesis de ácidos nucleicos de un aminoácido codificante así como mediante diversas formas de métodos recombinantes muy conocidos por los expertos en la especialidad.

Como se ha indicado anteriormente, la especificidad del anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o un derivado del mismo reside en la secuencia de aminoácidos de la CDR. El dominio variable (la cadena pesada VH y la cadena ligera VL) de un anticuerpo comprende tres regiones determinantes de la complementariedad llamadas a veces regiones hipervariables, flanqueadas por cuatro regiones marco relativamente conservadas o "FR". A menudo, la especificidad de un anticuerpo está determinada o está determinada en gran parte por una CDR, tal como una CDR de la cadena VH, o una pluralidad de CDR. El experto en la especialidad apreciará fácilmente que el dominio variable del anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o el derivado del mismo que tiene las CDR mencionadas anteriormente se puede usar para la construcción de anticuerpos de especificidad y función biológica mejoradas adicionalmente. Los anticuerpos de la presente invención o su cadena o cadenas de inmunoglobulina correspondientes se pueden modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la especialidad, por ejemplo, al usar una eliminación o eliminaciones, una inserción o inserciones, una sustitución o sustituciones, una adición o adiciones y/o una recombinación o recombinaciones de aminoácidos y/o cualquier otra modificación o modificaciones conocidas en la especialidad, solas o en combinación. Métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de DNA subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son muy conocidos por el experto en la especialidad; véase, p. ej., Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.

Opcionalmente, los anticuerpos se desimmunizan con propósitos terapéuticos. Un anticuerpo desimmunizado es una proteína carente de o reducida en epítomos que puedan ser reconocidos por linfocitos T cooperadores. Un ejemplo de cómo identificar dichos epítomos se muestra en Tangri y cols., (*J Immunol.* 174: 3187-96, 2005). La fabricación de fragmentos de anticuerpo desimmunizado o un derivado del mismo se puede llevar a cabo como se describe en las Pat. EE. UU. N° 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.

En una realización los anticuerpos de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, con la condición de que exhiban la actividad biológica deseada (Pat. EE. UU. N° 4.816.567; Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO 89/09622.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un anticuerpo quimerizado que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 38, 39, 41, 42 o al menos el dominio variable de la misma y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID N°: 37 o al menos el dominio variable de la misma.

En una realización adicional, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanizados o totalmente humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos se pueden generar según los métodos conocidos en la especialidad, tales como quimerización o injerto de CDR. Métodos alternativos para la producción de anticuerpos humanizados son muy conocidos en la especialidad y se describen, p. ej., en los documentos EP-A1 0 239 400 y WO 90/07861. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar, por ejemplo, siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y cols., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y cols., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y cols., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), al sustituir CDR o secuencias de CDR de origen no humano para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Según esto, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Pat. EE. UU. N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos no humanos.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 44 o al menos el dominio variable de la misma y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID N°: 43 o al menos el dominio variable de la misma.

Un método para generar anticuerpos totalmente humanos es a través del uso de cepas de ratones XenoMouse® que se han manipulado para contener fragmentos configurados de una línea germinal de un tamaño de hasta pero menor de 1.000 kb del locus de la cadena pesada humana y el locus de la cadena ligera κ. Véase Mendez y cols., (*Nature Genetics* 15:146-156 1997), y Green y Jakobovits (*J. Exp. Med.* 188:483-495, 1998). Las cepas XenoMouse® están disponibles de AMGEN, Inc. (previamente ABGENIX, Fremont, CA).

La producción de las cepas de ratones XenoMouse® se analiza y se esboza en las Patentes de EE. UU. N° 5.939.598, presentada el 30 de julio de 1992, 6.673.986, presentada el 15 de marzo de 1993, 6.114.598, presentada el 5 de junio de 1995, 6.075.181, presentada el 5 de junio de 1995, 6.162.963, presentada el 5 de junio de 1995,

6.150.584, presentada el 2 de octubre de 1996, la Publicación de EE. UU. 2003/0093820, presentada el 30 de noviembre de 2001, y las Patentes de EE. UU. N° 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las Patentes Japonesas n° 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véase, además, la Patente Europea N° EP 0 463 151 B1, concesión publicada el 12 de junio de 1996, la Solicitud de Patente Internacional N° WO9402602, publicada el 3 de febrero de 1994, la Solicitud de Patente Internacional N° WO9634096, publicada el 31 de octubre de 1996, WO9824893, publicada el 11 de junio de 1998, WO0076310, publicada el 21 de diciembre de 2000.

En un enfoque alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, un locus de Ig exógeno se imita a través de la inclusión de trozos (genes individuales) procedentes del locus de Ig. Así, uno o más genes VH, uno o más genes DH, uno o más genes JH, una región constante de μ y habitualmente una segunda región constante (preferiblemente una región constante de γ) se forman en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la Patente de EE. UU. N° 5.545.807 de Surani y cols. y las Patentes de EE. UU. N° 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458, cada una de Lonberg y Kay, las Patentes de EE. UU. N° 5.591.669 y 6.023.010 de Krimpenfort y Berns, las Patentes de EE. UU. N° 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 de Berns y cols., y la Patente de EE. UU. N° 5.643.763 de Choi y Dunn y las Patentes de EE. UU. de GenPharm International N° 5.569.825, presentada el 17 de diciembre de 1991, 5.789.650, presentada el 18 de marzo de 1992, 5.545.806, presentada el 16 de diciembre de 1992, 5.661.016, presentada el 26 de abril de 1993, 5.814.318, presentada el 22 de julio de 1993. Véanse además la Patente Europea N° 0 546 073 B1, las Solicitudes de Patente Internacional N° WO9203918, WO9222645, WO9222647, WO9312227, WO9400569, WO9425585, WO9614436, WO9713852 y WO9824884 y la Patente de EE. UU. N° 5.981.175.

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de fusión microcelular, se han introducido grandes trozos de cromosomas, o cromosomas enteros. Véanse las Solicitudes de Patente Europea N° 773 288 y 843 961. Adicionalmente, se han generado ratones KMTM, que son el resultado del cruce de ratones Tc de Kirin con ratones con minilocus de Medarex (Humab). Estos ratones poseen el transcromosoma de IgH humana de los ratones de Kirin y el transgén de la cadena κ de los ratones de Genpharm (Ishida y cols., Cloning Stem Cells 4:91-102, 2002).

Los anticuerpos humanos también se pueden derivar mediante métodos in vitro. Ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, presentación de fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed), presentación de ribosomas (CAT), presentación de levaduras, y similares.

Con propósitos terapéuticos, el anticuerpo se puede conjugar con un grupo efector terapéutico, p. ej. un grupo radiactivo o un grupo citotóxico.

Con propósitos de diagnóstico, el anticuerpo se ha marcado. Marcadores adecuados incluyen marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes o marcadores enzimáticos.

Anticuerpos adicionales para ser utilizados según la presente invención son los llamados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe, p. ej., en los documentos WO9110741, WO 9402602, WO 9634096 y WO 9633735.

Como se analiza anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de formas además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab' y F(ab')₂, así como en cadenas sencillas; véase, p. ej., el documento WO8809344.

Si se desea, los anticuerpos de la invención se pueden mutar en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, se puede realizar una mutación en una o más de las regiones CDR para incrementar o disminuir la Kd del anticuerpo para AXL, o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. Las técnicas en la mutagénesis dirigida son muy conocidas en la especialidad. Véase, p. ej., Sambrook y cols. y Ausubel y cols., anteriormente. Por otra parte, se pueden realizar mutaciones en un residuo de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con una línea germinal en una región variable de un anticuerpo para AXL. En otro aspecto, se pueden introducir mutaciones en una o más de las regiones marco. Se puede realizar una mutación en una región marco o dominio constante para incrementar la semivida del anticuerpo para AXL. Véase, p. ej., el documento WO0009560. También se puede realizar una mutación en una región marco o dominio constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente a otra molécula, o para alterar propiedades tales como la fijación del complemento. Se pueden realizar mutaciones en cada una de las regiones marco, el dominio constante y las regiones variables en un anticuerpo de mutación única. Alternativamente, se pueden realizar mutaciones en solo uno de las regiones marco, las regiones variables o el dominio constante en un anticuerpo de mutación única.

En un aspecto adicional, el anticuerpo puede tener un dominio constante con funciones efectoras, con lo que las células que expresan AXL que se han unido al anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o un derivado del mismo sobre la superficie celular pueden ser atacadas por funciones del sistema inmunitario. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser capaz de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por otra parte, el anticuerpo puede ser capaz de unirse a receptores de Fc sobre células efectoras, tales como

monocitos y células agresoras naturales (NK, por sus siglas en inglés), y participar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

En un aspecto adicional más, los anticuerpos de la invención son aplicables al tratamiento terapéutico, preferiblemente para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, enfermedades cardiovasculares, en particular arterosclerosis y trombosis, enfermedades relacionadas con la diabetes, en particular hipertrofia glomerular o nefropatía diabética, y particularmente de trastornos asociados con, acompañados de o provocados por la expresión, la sobreexpresión o la hiperactividad de AXL. Las enfermedades hiperproliferativas se seleccionan preferiblemente de trastornos asociados con, acompañados de o provocados por expresión, sobreexpresión o hiperactividad de AXL, tales como cáncer, p. ej. cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, linfoma folicular, leucemia mielóide, cáncer de piel/melanoma, glioblastoma, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, esófago de Barrett y cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello, o enfermedades hiperplásticas y neoplásticas u otras enfermedades hiperproliferativas que expresan o sobreexpresan AXL.

En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para la coadministración con un agente antineoplástico para el tratamiento de uno de los trastornos mencionados anteriormente.

La coadministración, según se usa en la presente memoria, incluye la administración de un anticuerpo de la presente invención con un agente antineoplástico, preferiblemente un agente antineoplástico inductor de apoptosis. El término coadministración incluye además la administración del anticuerpo de la presente invención y el agente antineoplástico, preferiblemente un agente antineoplástico inductor de apoptosis, en la forma de una sola composición o en la forma de dos o más composiciones distintas. La coadministración incluye la administración de un anticuerpo de la presente invención con un agente antineoplástico, preferiblemente un agente antineoplástico inductor de apoptosis, simultáneamente (es decir, al mismo tiempo) o secuencialmente (es decir, a intervalos).

La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o el derivado del mismo de la invención. La molécula de ácido nucleico de la invención que codifica el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o el derivado del mismo descrito anteriormente puede ser, p. ej., DNA, cDNA, RNA o DNA o RNA producido sintéticamente o una molécula de ácido nucleico química producida recombinantemente que comprende cualquiera de esas moléculas de ácido nucleico bien solas o bien en combinación. La molécula de ácido nucleico también puede ser DNA genómico correspondiente a todo el gen o una porción sustancial del mismo o a fragmentos y derivados del mismo. La secuencia de nucleótidos puede corresponder a la secuencia de nucleótidos natural o puede contener una sola o múltiples sustituciones, eliminaciones o adiciones de nucleótidos. En una realización preferida particular de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es una molécula de cDNA.

La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal de la invención y

(b) un ácido nucleico complementario de cualquiera de las secuencias de (a).

La invención también se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención. Dicho vector puede ser, por ejemplo, un fago, un plásmido, un vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes para la replicación o incompetentes para la replicación. En el último caso, generalmente se producirá propagación viral solamente en células huésped complementarias.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden estar enlazadas a un vector que contiene marcadores seleccionables para la propagación en un huésped. Generalmente, un vector plasmídico se introduce en un precipitado tal como un precipitado de fosfato cálcico o un precipitado de cloruro de rubidio, o en un complejo con un lípido cargado o en agrupamientos basados en carbono, tales como fulerenos. Si el vector es un virus, se puede empaquetar in vitro usando una línea celular de empaquetamiento apropiada antes de la aplicación a células huésped.

Preferiblemente, el vector de la invención es un vector de expresión en el que la molécula de ácido nucleico está conectada operativamente a una o más secuencias de control que permiten la transcripción y opcionalmente la expresión en células huésped procarióticas y/o eucarióticas. La expresión de dicha molécula de ácido nucleico comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico, preferiblemente en un mRNA traducible. Elementos reguladores que aseguran la expresión en células eucarióticas, preferiblemente células de mamífero, son muy conocidos por los expertos en la especialidad. Habitualmente, comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Elementos reguladores adicionales pueden incluir mejoradores de la transcripción así como de la traducción. Posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procarióticas comprenden, p. ej., el promotor lac, trp o tac en *E. coli*, y ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células eucarióticas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor de CMV, SV40, RSV (virus del sarcoma de Rous), un mejorador de CMV, un mejorador de SV40 o un intrón de globina en células de

5 mamífero y otros animales. Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, tales elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de SV40 o el sitio poli-A de tk, aguas abajo del polinucleótido. En este contexto, se conocen en la especialidad
 10 vectores de expresión adecuados tales como el vector de expresión de cDNA de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDMB, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) o pSPORT1 (GIBCO BRL). Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia o elección como diana de genes. Se pueden usar vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vacunal, virus adenoasociado, herpesvirus o virus del papiloma bovino, para el aporte de los polinucleótidos o el vector de la invención a la población de células
 15 diana. Métodos que son muy conocidos por los expertos en la especialidad se pueden usar para construir vectores virales recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, Tercera Edición) N.Y. y Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden reconstituir en liposomas para el aporte a células diana. La invención se refiere además a un huésped que comprende el vector de la invención. Dicho huésped puede ser una célula procariótica o eucariótica o un animal transgénico no humano. El polinucleótido o el vector de la invención que está presente en el huésped bien se puede integrar en el genoma del huésped o bien se puede mantener extracromosómicamente. A este respecto, también se debe entender que la molécula de ácido nucleico de la invención se puede usar para la "elección como diana de genes" y/o "la sustitución de genes", para restaurar un gen mutante o para crear un gen mutante a través de recombinación homóloga; véase, por ejemplo, Mouellic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990), 4712-4716; Joyner, *Gene Targeting, A Practical Approach*, Oxford University Press.

25 El huésped puede ser una célula procariótica o eucariótica, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal, de mamífero o, preferiblemente, humana. Células fúngicas preferidas son, por ejemplo, las del género *Saccharomyces*, en particular las de la especie *S. cerevisiae*. Se entiende que el término "procariótico" incluye todas las bacterias que se pueden transformar o transfectar con un polinucleótido para la expresión de un polipéptido variante de la invención. Huéspedes procarióticos pueden incluir bacterias gramnegativas así como grampositivas tales como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Un polinucleótido que codifica una forma mutante de polipéptidos variantes de la invención se puede usar para transformar o transfectar el huésped usando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por los de experiencia normal en la especialidad. Métodos para preparar genes conectados operativamente fusionados y expresarlos en células de bacterias o animales son muy conocidos en la especialidad (Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, Tercera Edición). Las construcciones genéticas y los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para la expresión de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos variantes de la invención en, p. ej., huéspedes procarióticos. En general, vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficaz de la molécula de ácido nucleico insertada se usan en relación con el huésped. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor y un terminador, así como genes específicos que son capaces de proporcionar una selección fenotípica de las células transformadas. Los huéspedes procarióticos transformados pueden hacerse crecer en fermentadores y cultivarse según técnicas conocidas en la especialidad para alcanzar un crecimiento celular óptimo. A continuación, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpo o derivados de los mismos de la invención se pueden aislar del medio de crecimiento, los lisados celulares o las fracciones de membrana celular. El aislamiento y la purificación de los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpo o derivados de los mismos de la invención expresados microbianamente o de otro modo pueden ser mediante cualesquiera medios convencionales tales como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como las que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales.

45 En una realización preferida de la divulgación, el huésped es una célula bacteriana, fúngica, vegetal, de anfibio o animal. Células animales preferidas incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), células de riñón de cría de hámster (BHK, por sus siglas en inglés), células de riñón de mono (COS, por sus siglas en inglés), células 3T3, células NSO y un número de otras líneas celulares incluyendo células humanas, por ejemplo Per.C6. En otra realización preferida, dicha célula animal es un célula de insecto. Células de insecto preferidas incluyen, pero no se limitan a, células de las líneas celulares SF9.

En una realización más preferida de la divulgación, dicho huésped es una célula humana o una línea celular humana. Dichas células humanas incluyen, pero no se limitan a, células de riñón embrionario humano (HEK293, 293T, 293 Freestyle). Por otra parte, dichas líneas celulares humanas incluyen, pero no se limitan a, células HeLa, células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células A549.

55 La invención también proporciona animales no humanos transgénicos que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de la invención que se pueden usar para producir anticuerpos de la invención. Los anticuerpos se pueden producir en y recuperar de tejido o fluidos corporales, tales como leche, sangre u orina, de cabras, vacas, caballos, cerdos, ratas, ratones, conejos, hámsteres u otros mamíferos. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N° 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957. Como se describe anteriormente, animales transgénicos no humanos que comprenden locus de inmunoglobulina humana se pueden producir al inmunizar con AXL o una porción de la misma.

La invención se refiere adicionalmente a un método para la preparación de un anticuerpo, que comprende cultivar el

huésped de la invención bajo condiciones que permitan la síntesis de dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo de dicho cultivo.

Los huéspedes transformados pueden hacerse crecer en fermentadores y cultivarse según técnicas conocidas en la especialidad para alcanzar un crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos enteros, sus dímeros cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se pueden purificar según procedimientos estándar de la especialidad, incluyendo precipitación de sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares; véase Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982). A continuación, el anticuerpo o su cadena o cadenas de inmunoglobulina correspondientes de la invención se pueden aislar del medio de crecimiento, los lisados celulares o las fracciones de membrana celular. El aislamiento y la purificación de, p. ej., los anticuerpos o las cadenas de inmunoglobulina expresados microbianamente de la invención pueden ser mediante cualquier medio convencional tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como las que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, p. ej., contra la región constante del anticuerpo de la invención.

Será evidente para los expertos en la especialidad que los anticuerpos de la invención se pueden acoplar además a otros restos, p. ej., para aplicaciones de orientación de fármacos a una diana y obtención de imágenes. Tal acoplamiento se puede efectuar químicamente después de la expresión del anticuerpo o el antígeno hacia el sitio de empalme o el producto de acoplamiento se puede manipular hasta el anticuerpo o antígeno de la invención a nivel del DNA. A continuación, los DNA se expresan en un sistema hospedante adecuado, y las proteínas expresadas se recogen y se renaturalizan, si es necesario.

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo se acopla a un efector, tal como un radioisótopo o un agente quimioterapéutico tóxico. Preferiblemente, estos conjugados de anticuerpo son útiles para elegir como diana células, p. ej. células cancerosas, que expresan AXL, para la eliminación. La conexión de anticuerpos/fragmentos de anticuerpo de la invención a radioisótopos, p. ej., proporciona ventajas para los tratamientos de tumores. A diferencia de la quimioterapia y otras formas de tratamiento del cáncer, la radioinmunoterapia o la administración de una combinación de radioisótopo-anticuerpo elige directamente como diana las células cancerosas con un daño mínimo al tejido sano normal circundante. Radioisótopos preferidos incluyen, p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I . Por otra parte, los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar el cáncer cuando se conjugan con fármacos quimioterapéuticos tóxicos tales como geldanamicina (Mandler y cols., J. Natl. Cancer Inst., 92(19), 1549-51 (2000)) y maitansina, por ejemplo, el fármaco maitansinoide DM1 (Liu y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:8618-8623 (1996), y auristatina-E o monometilauristatina-E (Doronina y cols., Nat. Biotechnol. 21:778-784 (2003) o caliqueamicina). Se emplean en esta tecnología diferentes conectores que liberan los fármacos bajo condiciones ácidas o reductoras o bajo la exposición a proteasas específicas. Los anticuerpos de la invención se pueden conjugar como se describe en la especialidad.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, la molécula de ácido nucleico, el vector, el huésped de la invención o un anticuerpo obtenido mediante el método de la invención.

El término "composición", según se emplea en la presente memoria, comprende al menos un compuesto de la invención. Preferiblemente, tal composición es una composición farmacéutica o de diagnóstico.

Se prefiere que dicha composición farmacéutica comprenda un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica divulgada en la presente memoria puede ser parcialmente útil para el tratamiento de trastornos como los definidos en las reivindicaciones.

El trastorno es cáncer o cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, linfoma folicular, leucemia mieloide, cáncer de piel/melanoma, glioblastoma, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, esófago de Barrett y cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello, u otras enfermedades hiperplásticas y neoplásticas.

El término "hiperactividad" en la presente memoria se refiere a señalización de AXL descontrolada que puede estar provocada por una falta y/o disfunción de la regulación negativa. A modo de ejemplo, la regulación negativa comprende la desfosforilación, degradación y/o endocitosis de proteínas. Por otra parte, la señalización de AXL descontrolada puede ser el resultado de alteraciones genéticas, bien somáticas o bien de la línea germinal, que dan como resultado cambios de la secuencia de aminoácidos de AXL.

Ejemplos de portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la especialidad e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales portadores se pueden formular mediante métodos convencionales muy conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar de diferentes modos, p. ej., mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial. Las composiciones de la invención

también se pueden administrar directamente al sitio diana, p. ej., mediante aporte biolístico a un sitio diana externo o interno, como el cerebro. El régimen de dosificación será determinado por el médico responsable y los factores clínicos. Como se conoce bien en las especialidades médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño, la superficie corporal, la edad del paciente, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Una materia proteínica farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 µg y 100 mg/kg de peso corporal por dosis; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, considerando especialmente los susodichos factores. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 pg a 100 mg por kilogramo de peso corporal por minuto.

El progreso se puede comprobar mediante determinación periódica. Las composiciones de la invención se pueden administrar localmente o sistémicamente. Preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de lactato de Ringer o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basado en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Por otra parte, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Se prefiere particularmente que la composición farmacéutica comprenda agentes activos adicionales como, p. ej., un agente antineoplástico adicional, un inhibidor de molécula pequeña, un agente antitumoral o un agente quimioterapéutico.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-AXL de la invención en combinación con al menos un agente antineoplástico adicional. Dicha combinación es eficaz, por ejemplo, para inhibir el crecimiento celular anormal.

Se conocen actualmente en la especialidad muchos agentes antineoplásticos. En general, el término incluye todos los agentes que sean capaces de prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos hiperproliferativos. En una realización, el agente antineoplástico se selecciona del grupo de proteínas terapéuticas incluyendo, pero no limitadas a, anticuerpos o proteínas inmunomoduladoras. En otra realización, el agente antineoplástico se selecciona del grupo de inhibidores de molécula pequeña o agentes quimioterapéuticos que consisten en inhibidores mitóticos, inhibidores de cinasa, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos de intercalación, inhibidores de factores de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de histona desacetilasa, agentes antisuervivencia, modificadores de respuestas biológicas, antihormonas, p. ej. antiandrógenos, y agentes antiangiogénesis.

Ejemplos específicos de agentes antineoplásticos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen, por ejemplo, gefitinib, lapatinib, sunitinib, pemetrexed, bevacizumab, cetuximab, imatinib, trastuzumab, alemtuzumab, rituximab, erlotinib, bortezomib y similares. Otros agentes antineoplásticos específicos para ser usados en las composiciones que se describen y reivindican en la presente memoria incluyen, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos tales como capecitabina, daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas nitrogenadas, melfalano, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina (CA), 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colquicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido, trimetrexato, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, generalmente, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15ª Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow y cols., eds., Rahway, N.J. En particular, se prefieren agentes antineoplásticos tales que induzcan la apoptosis.

Cuando se usan con los anticuerpos para AXL descritos, tales agentes antineoplásticos se pueden usar individualmente (p. ej., 5-FU y un anticuerpo), secuencialmente (p. ej., 5-FU y un anticuerpo durante un período de tiempo seguido por MTX y un anticuerpo) o en combinación con uno o más de otros de tales agentes antineoplásticos (p. ej., 5-FU, MTX y un anticuerpo, o 5-FU, radioterapia y un anticuerpo).

El término agente antineoplástico también puede incluir procedimientos terapéuticos como, por ejemplo, irradiación o radioterapia.

La composición farmacéutica de la invención se puede usar en medicina humana y también se puede usar con propósitos veterinarios.

Adicionalmente, la invención se refiere al uso del anticuerpo de la invención, la molécula de ácido nucleico, el vector,

5 el huésped de la invención o un anticuerpo obtenido mediante el método de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, enfermedades cardiovasculares, en particular arterosclerosis y trombosis, enfermedades relacionadas con la diabetes, en particular hipertrofia glomerular o nefropatía diabética, es decir, de trastornos asociados con, acompañados de o provocados por la expresión, la sobreexpresión o la hiperactividad de AXL.

10 Una enfermedad hiperproliferativa, según se menciona anteriormente, incluye cualquier neoplasia, es decir cualquier nuevo crecimiento anormal y/o descontrolado de tejido. El término "nuevo crecimiento descontrolado de tejido", según se usa en la presente memoria, puede depender de una disfunción y/o pérdida de regulación del crecimiento. Una enfermedad hiperproliferativa incluye enfermedades tumorales y/o cáncer, tal como cánceres metastásicos o invasivos.

15 En una realización preferida del uso de la invención, dicha enfermedad hiperproliferativa es en particular cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, linfoma folicular, leucemia mieloide, cáncer de piel/melanoma, glioblastoma, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, esófago de Barrett y cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello, o enfermedades hiperplásticas y neoplásticas u otras enfermedades hiperproliferativas que expresan o sobreexpresan AXL.

20 En otra realización más, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-AXL de la presente invención para la fabricación de un medicamento para la coadministración con un agente antineoplástico para el tratamiento de uno de los trastornos mencionados anteriormente.

25 Según una realización preferida adicional, la presente invención se dirige al uso de un anticuerpo anti-AXL según se define en las reivindicaciones para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer resistente a fármacos.

Además, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende el anticuerpo de la invención, la molécula de ácido nucleico, el vector, el huésped de la invención o un anticuerpo obtenido mediante el método de la invención y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

30 La composición de diagnóstico de la invención es útil en la detección de la expresión, sobreexpresión o hiperactividad no deseadas de la AXL de mamífero en diferentes células, tejidos u otra muestra adecuada, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo de la invención y determinar la presencia de AXL en la muestra. Según esto, la composición de diagnóstico de la invención se puede usar para evaluar el comienzo o el estado patológico de una enfermedad hiperproliferativa.

35 Por otra parte, células malignas, tales como células cancerosas que expresan AXL, pueden servir como diana para el anticuerpo de la invención. Las células que se han unido al anticuerpo de la invención podrían así ser atacadas por las funciones del sistema inmunitario tales como el sistema del complemento o por citotoxicidad mediada por células, de ese modo reduciendo el número de o erradicando células cancerosas. Estas consideraciones se aplican igualmente al tratamiento de metástasis y tumores recurrentes.

40 En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo de la invención se acopla a un grupo de marcaje. Tales anticuerpos son particularmente adecuados para aplicaciones de diagnóstico. Según se usa en la presente memoria, el término "grupo de marcaje" se refiere a un marcador detectable, p. ej. un aminoácido radiomarcado o restos biotinilados que se pueden detectar mediante avidina marcada. Diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas, tales como anticuerpos, se conocen en la especialidad y se pueden usar al llevar a cabo la presente invención. Ejemplos grupos de marcaje adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej. ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), grupos fluorescentes (p. ej. FITC, rodamina, fósforos de lantánido), grupos enzimáticos (p. ej. peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotini, o epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un segundo indicador (p. ej. secuencias del par de la cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas).

45 En ciertos aspectos, puede ser deseable que los grupos de marcaje estén ligados por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

50 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para evaluar la presencia de células que expresan AXL que comprende poner en contacto el anticuerpo de la invención con células o un tejido que presuntamente portan AXL sobre su superficie. Métodos adecuados para la detección de la expresión de AXL en una muestra pueden ser un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) o inmunohistoquímica (IHC).

55 Un ensayo ELISA se puede llevar a cabo en un formato de placa de microvaloración, en el que un anticuerpo para AXL es adsorbido en, p. ej., los pocillos de una placa de microvaloración. Los pocillos se enjuagan y se tratan con un agente de bloqueo tal como proteína de leche o albúmina para evitar la adsorción no específica del analito. Posteriormente, los pocillos se tratan con una muestra de prueba. Después de separar por enjuague la muestra de prueba o el patrón, los pocillos se tratan con un segundo anticuerpo para AXL que está marcado, p. ej. mediante

conjugación con biotina. Después de separar por lavado el exceso de anticuerpo secundario, el marcador se detecta, p. ej. con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) conjugada a avidina y un sustrato cromogénico adecuado. La concentración del antígeno AXL en las muestras de prueba se determina por comparación con una curva estándar desarrollada a partir de muestras estándar.

- 5 Para la IHC, se pueden usar tejidos embebidos en parafina, en donde los tejidos, p. ej., en primer lugar se desparafinan en xileno y a continuación se deshidratan, p. ej. con etanol, y se enjuagan con agua destilada. Los epítomos antigénicos enmascarados por fijación en formalina e imbibición en parafina se pueden exponer mediante desenmascaramiento del epítomo, digestión enzimática o saponina. Para el desenmascaramiento del epítomo, las secciones de parafina se pueden calentar en una olla de vapor, un baño de agua o un horno de microondas durante 20-40 min. en una solución para la recuperación del epítomo como, por ejemplo, solución de HCl 2 N (pH 1,0). En el caso de una digestión enzimática, las secciones de tejido se pueden incubar a 37°C durante 10-30 minutos en diferentes soluciones de enzima tales como proteinasa K, tripsina, pronasa, pepsina, etc.

- 15 Después de separar por enjuague la solución de recuperación del epítomo o la enzima en exceso, las secciones de tejido se tratan con un tampón de bloqueo para evitar interacciones inespecíficas. El anticuerpo para AXL primario se añade en concentraciones apropiadas. El exceso de anticuerpo primario se separa por enjuague y las secciones se incuban en solución de bloqueo de peroxidasa durante 10 min. a temperatura ambiente. Después de otra etapa de lavado, las secciones de tejido se incuban con un anticuerpo marcado secundario, p. ej. marcado con un grupo que podría servir como un anclaje para una enzima. Ejemplos de los mismos son anticuerpos secundarios marcados con biotina que son reconocidos por peroxidasa de rábano picante acoplada a estreptavidina. La detección del complejo anticuerpo/enzima se consigue incubando con un sustrato cromogénico adecuado.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para bloquear la función de AXL que comprende poner en contacto el anticuerpo de la invención con células o un tejido que presuntamente portan AXL sobre su superficie bajo condiciones en las que el anticuerpo es capaz de bloquear la función de AXL. El contacto pueden ser in vitro o in vivo.

- 25 El presente documento también describe un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa, enfermedades cardiovasculares, en particular arterosclerosis y trombosis, enfermedades relacionadas con la diabetes, en particular hipertrofia glomerular o nefropatía diabética, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis adecuada del anticuerpo de la presente invención. La enfermedad hiperproliferativa se selecciona de trastornos asociados con, acompañados de o provocados por expresión, sobreexpresión o hiperactividad de AXL, tales como cáncer, p. ej. cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, linfoma folicular, leucemia mieloide, cáncer de piel/melanoma, glioblastoma, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, esófago de Barrett y cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello, o enfermedades hiperplásticas y neoplásticas u otras enfermedades hiperproliferativas que expresan o sobreexpresan AXL.

- 35 Según otro aspecto, el cáncer que se va a tratar es un cáncer resistente a fármacos.

El documento se refiere además a un método para tratar una enfermedad en el que el anticuerpo de la invención se administra a un mamífero y en el que dicha enfermedad está correlacionada directamente o indirectamente con el nivel anormal de expresión o actividad de AXL.

- 40 Finalmente, la invención se refiere a un estuche que comprende un anticuerpo anti-AXL de la invención, la molécula de ácido nucleico que codifica dichos componentes y/o el vector de la invención.

Todas las realizaciones que cubren los compuestos divulgados en la presente memoria se pueden usar como compuestos individuales o en combinación para la preparación de un medicamento.

Leyendas de las figuras

- 45 Figura 1. Análisis por citometría de flujo de AXL de la superficie celular en fibroblastos Rati-Mock y Rati-AXL cl.2. Células Rati-Mock policlonales y Rati-AXL cl.2 clonales, generadas mediante infección de fibroblastos Rati con virus ecotrófico pLXSN y pLXSN-hAXL, respectivamente, se recogieron y se tiñeron con anticuerpo de control de ratón 72A1 (cuadro izquierdo) o anticuerpo primario de ratón anti-AXL MAB154 (cuadro derecho) en 3 µg/ml y anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de ratón conjugado a PE. Véase el texto para los detalles. La tinción de las células Rati-AXL cl.2 da como resultado un cambio de tres órdenes de magnitud y demuestra la sobreexpresión de AXL sobre la superficie de estas células.

- 50 Figura 2. Análisis por citometría de flujo de AXL de la superficie celular en fibroblastos NIH3T3-Mock y NIH3T3-AXL cl.7. Células NIH3T3-Mock policlonales y NIH3T3-AXL cl.7 clonales, generadas mediante infección de fibroblastos NIH3T3 con virus ecotrófico pLXSN y pLXSN-AXL, respectivamente, se recogieron y se tiñeron con anticuerpo de control de ratón 72A1 (cuadro izquierdo) o anticuerpo primario de ratón anti-AXL MAB154 (cuadro derecho) en 3 µg/ml y anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de ratón conjugado a PE. Véase el texto para los detalles. La tinción de las células NIH3T3-AXL cl.7 da como resultado un cambio de dos órdenes de magnitud y demuestra la sobreexpresión de AXL sobre la superficie de estas células.

Figura 3. Análisis por citometría de flujo de la reactividad cruzada de anticuerpos de rata anti-AXL con AXL de ratón y mono cynomolgus así como Mer y Sky humanas. Fibroblastos HEK293T se transfectaron transitoriamente con pcDNA3, pcDNA3-hAXL, pcDNA3mAXL, pcDNA3-cyAXL, pcDNA3-hMer o pcDNA3-hSky. Las células se recogieron y se tiñeron con 10 µg/ml de anticuerpo primario anti-AXL 1D5, 11 D5, 11B7, 10D12, 6E7, 2A1, 11D7 o 12B7 y/o anticuerpo secundario de burro contra inmunoglobulinas de rata conjugado a PE, o anticuerpo secundario de burro contra inmunoglobulinas de ratón conjugado a PE sólo para el control. Véase el texto para los detalles. Excepto el 12B7, que muestra una reactividad cruzada moderada con AXL de ratón así como Mer y Sky humanas, ninguno de los anticuerpos anti-AXL reaccionaba cruzadamente con estas moléculas. En contraste, todos los anticuerpos anti-AXL probados reaccionaban cruzadamente con AXL de mono cynomolgus.

Figura 4. Experimentos de ELISA para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre la fosforilación del receptor de AXL. Fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 (A) y células de cáncer de pulmón NCI-H292 (B) se privaron de nutrientes, se preincubaron con 10 µg/ml de anticuerpo de control de ratón 72A1 así como los anticuerpos de rata anti-AXL 2A1, 11 D7, 11 D5, 11 B7, 6E7 o 10D12, se trataron con o sin 400 ng/ml de mGas6, y se sometieron a lisis. Los lisados se transfirieron a placas de 96 pocillos Maxi-Sorp revestidas con anticuerpo antifosfotirosina 4G10, que a continuación se lavaron y se incubaron con 0,5 µg/ml de anticuerpo de rata anti-AXL 12B7 biotinilado, estreptavidina conjugada a AP y solución de sustrato AttoPhos a fin de recoger las intensidades de fluorescencia. Véase el texto para los detalles. Los anticuerpos de rata anti-AXL 11 B7, 11 D5, 6E7 y 10D12 fueron capaces de bloquear o reducir la activación de AXL mediada por ligando según se indica por una disminución de la fosforilación, y así se consideran anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, los anticuerpos de rata anti-AXL 2A1 y 11 D7 estimulan la activación basal de AXL según se indica por un incremento de la fosforilación, no reducen significativamente la activación de AXL mediada por ligandos y por lo tanto se consideran anticuerpos anti-AXL agonistas.

Figura 5. Experimentos de ELISA para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre la fosforilación de p42/p44 MAP-cinasa. Células de cáncer de cuello uterino CaSki se privaron de nutrientes, se preincubaron con 10 µg/ml del anticuerpo de control isotópico 1 D5 así como los anticuerpos de rata anti-AXL 11 D5, 11 B7 o 2A1, se trataron con o sin 400 ng/ml de mGas6 y se fijaron con formaldehído. Las células se lavaron, se desactivaron y se incubaron con anticuerpo primario para MAP cinasa anti-fosfo-p44/p42 (Thr202/Tyr204), anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP y solución de tetrametilbencidina a fin de medir las intensidades de absorbancia. Véase el texto para los detalles. Los anticuerpos de rata anti-AXL 11B7 y 11D5 fueron capaces de reducir la activación de p42/p44 MAP-cinasa mediada por ligando como se indica por una disminución de la fosforilación, y así se consideran anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, el anticuerpo de rata anti-AXL 2A1 estimula la actividad basal de p42/p44 MAP-cinasa como se indica por un incremento de la fosforilación, no reduce la activación de p42/p44 MAP-cinasa mediada por ligando, y por lo tanto se considera un anticuerpo anti-AXL agonista.

Figura 6. Experimentos de ELISA para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre la fosforilación de Akt-cinasa. Fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 (A) y células de cáncer de pulmón CaLu-1 (B) se privaron de nutrientes, se preincubaron con 10 µg/ml del anticuerpo de control isotópico 1 D5 así como los anticuerpos de rata anti-AXL 11 D5, 11 B7 o 2A1, se trataron con o sin 400 ng/ml de mGas6, y se fijaron con formaldehído. Las células se lavaron, se desactivaron y se incubaron con anticuerpo primario antifosfo-Akt (Ser473), anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP y solución de tetrametilbencidina a fin de medir las intensidades de absorbancia. Véase el texto para los detalles. Los anticuerpos de rata anti-AXL 11B7 y 11D5 fueron capaces de bloquear o reducir la activación de Akt-cinasa mediada por ligando como se indica por una disminución de la fosforilación, y así se consideran anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, el anticuerpo de rata anti-AXL 2A1 estimula la activación basal de Akt-cinasa como se indica por un incremento en la fosforilación, no reduce la activación de Akt-cinasa mediada por ligando, y por lo tanto se considera un anticuerpo anti-AXL agonista.

Figura 7. Experimentos de ELISA para comparar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata y quiméricos sobre la fosforilación de Akt-cinasa. Fibroblastos NIH3T3-AXL cm7. se privaron de nutrientes, se preincubaron con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml y 1 µg/ml de anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 o anticuerpo quimérico anti-AXL ch11B7, así como 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml de anticuerpo de rata anti-AXL 11 D5 o anticuerpo quimérico anti-AXL ch11 D5, se trataron con o sin 400 ng/ml de mGas6 y se fijaron con formaldehído. Las células se lavaron, se desactivaron y se incubaron con anticuerpo primario anti-fosfo-Akt (Ser473), anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP y solución de tetrametilbencidina a fin de medir las intensidades de absorbancia. Véase el texto para los detalles. El anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 y el anticuerpo quimérico anti-AXL ch11 B7 así como el anticuerpo de rata anti-AXL 11 D5 o el anticuerpo quimérico anti-AXL ch11D5 fueron capaces de inhibir la activación de Akt-cinasa mediada por ligando como se indica por una disminución de la fosforilación. Así, en comparación con sus homólogos de rata respectivos, los anticuerpos quiméricos anti-AXL ch11 B7 y ch11 D5 mantuvieron la actividad.

Figura 8. Experimentos de ELISA de competición para investigar las propiedades de unión de anticuerpos de rata anti-AXL. Placas Maxi-Sorp de 96 pocillos se revistieron con 1 de $\mu\text{g/ml}$ AXL-ECD humano y se preincubaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo de control isotópico 1 D5 o anticuerpos de rata anti-AXL 11 B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7 o 2A1 no biotinilados. Después de la incubación con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo de control isotópico 1 D5 biotinilado o anticuerpos de rata anti-AXL 11 B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7 o 2A1 biotinilados, y la adición de estreptavidina conjugada a AP y solución de sustrato AttoPhos, la fluorescencia se recogió para medir los anticuerpos biotinilados unidos. Véase el texto para los detalles. El anticuerpo de control 1D5 no se unió a AXL-ECD. Los anticuerpos anti-AXL antagonistas 11B7, 11D5, 6E7 y 10D12 compitieron entre sí por el mismo epítipo o epítipos estructuralmente adyacentes. Los anticuerpos agonistas 11 D7 y 2A1 reconocen diferentes epítipos y no compiten con los anticuerpos antagonistas por la unión al AXL-ECD.

Figura 9. Ensayo de curación de heridas/raspado para investigar los efectos de anticuerpos de rata y quiméricos anti-AXL sobre la migración y la proliferación celular. Después de crecer hasta la confluencia, células de cáncer de pulmón NCI-H292 se privaron de nutrientes y se hirieron con una punta de pipeta. En presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de control isotópico 1 D5, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11 D5, 11 B7, 6E7 o 10D12, los anticuerpos quiméricos anti-AXL chn11 D5 IgG2 y chn11B7 IgG2, los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 2A1 y 11 D7, así como 10 $\mu\text{g/ml}$ de Eributix o Sutent 5 μM , se permitió que las células repoblaran la superficie de clarificación. Después de 24 h, las células se fijaron y se tiñeron y se tomaron fotografías de las heridas. Véase el texto para los detalles. En comparación con el anticuerpo de control isotópico 1 D5, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11 D5, 11 B7, 6E7 y 10D12, así como los anticuerpos quiméricos anti-AXL chn11D5 IgG2 y chn11B7 IgG2 redujeron la repoblación de la superficie clarificada, mientras que los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 2A1 y 11 D7 condujeron a completar el cierre de las heridas.

Figura 10. Ensayo en cámara de Boyden/Transwell para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre la migración celular dirigida. Fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 privados de suero se preincubaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos de rata anti-AXL 4A6, 11 B7 o 2A1, se dispusieron sobre inserciones FluoreBlock revestidas con colágeno I y se expusieron a medio libre de suero con o sin Gas6 en el compartimento inferior. Después de 7 h, las células transmigradas se tiñeron con calceína-AM, y se midió la fluorescencia de cada pocillo. Véase el texto para los detalles. El anticuerpo anti-AXL antagonista 11 B7 redujo la migración tanto basal como inducida por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7, mientras que el anticuerpo de rata anti-AXL agonista 2A1 incrementó la migración inducida por ligando y, en particular, basal de células NIH3T3-AXL cl.7. El anticuerpo 4A6 no afectó a la migración celular dirigida.

Figura 11. Ensayo AlamarBlue™ para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre la proliferación celular inducida por Gas6. Fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 privados de suero se preincubaron con 20 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de control de ratón 72A1, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11D5 y 11B7, así como el anticuerpo anti-AXL agonista 2A1, y se hicieron crecer en ausencia o presencia de 400 ng/ml de Gas6. Después de 4 días, se añadió AlamarBlue™ a las células y se midió la absorbancia. Véase el texto para los detalles. Los anticuerpos anti-AXL antagonistas 11 D5 y 11 B7 inhibieron la proliferación inducida por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7, mientras que el anticuerpo de rata anti-AXL agonista 2A1 incrementó la proliferación inducida por ligando y, en particular, basal de células NIH3T3-AXL cl.7.

Figura 12. Ensayo de caspasa-3/7 para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre la antiapoptosis mediada por Gas6. Fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 privados de suero se preincubaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de control isotópico 1 D5, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11B7 y 11D5, o los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 11 D7 y 2A1, y se trataron con o sin Gas6. Se añadió solución de sustrato Apo-ONE y se recogió la fluorescencia para medir la actividad de caspasa-3/7. Véase el texto para los detalles. En comparación con el anticuerpo de control isotópico, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11B7 y 11D5 redujeron la antiapoptosis mediada por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 privados de suero, y así indujeron la apoptosis. En contraste, los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 2A1 y 11 D7 indujeron la antiapoptosis de células NIH3T3-AXL cl.7 privadas de suero independientemente de la ausencia o la presencia de Gas6, y por lo tanto inhibieron la apoptosis.

Figura 13. Ensayo de angiogénesis celular basado en esferoides para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre la ramificación de células endoteliales inducida por VEGF-A. Esferoides HUVEC se embebieron en un gel de colágeno tridimensional, se estimularon con 25 ng/ml de VEGF-A y se trataron con las concentraciones indicadas de los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11 B7 (A) y 11 D5 (B) durante 24 h. Se analizó la media \pm EEM de la longitud acumulativa de la ramificación de 19 esferoides seleccionados aleatoriamente por punto de datos (cuadro izquierdo) y se determinó la inhibición relativa por el anticuerpo (cuadro derecho). El ajuste de las curva de IC_{50} y el cálculo de los valores de IC_{50} se realizó con GraphPad Prism 4.03. Véase el texto para los detalles. Los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 11B7 y 11D5 inhibieron la ramificación de HUVEC estimulada por VEGF-A en el ensayo de angiogénesis basado en esferoides de un modo dependiente de la dosis. Mientras que el tratamiento con la concentración más alta de 11 B7 redujo la ramificación de HUVEC hasta niveles basales, la inhibición con la concentración más alta de

11 D5 no fue tan eficaz (cuadro izquierdo). La ramificación de HUVEC se inhibió con valores de IC_{50} de $9,8 \times 10^{-8}$ M y $7,0 \times 10^{-7}$ M para 11B7 y 11D5, respectivamente (cuadro derecho).

Figura 14. Modelo de xenoinjerto ortotópico para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre el crecimiento de carcinoma de próstata humano en ratones atímicos. Células de carcinoma de próstata PC-3-LN se implantaron ortotópicamente en la próstata de ratones NMRI-nu/nu. Los animales fueron aleatorizados en 4 grupos y recibieron 25 mg/kg del anticuerpo de control isotópico 1 D5 o el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7, así como 40 mg/kg de Sutent o 12,5 mg/kg de Taxotere. Durante el período de tratamiento, el crecimiento de tumores PC-3-LN que crecen ortotópicamente así como metástasis periféricas se comprobó una vez a la semana a través de la captación de imágenes de bioluminiscencia in vivo el día 15, el día 23, el día 29 y el día 34. Véase el texto para los detalles. En comparación con el anticuerpo de control isotópico 1 D5, el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7 redujo el crecimiento global de tumores de próstata PC-3-LN en ratones atímicos.

Figura 15. Modelo de xenoinjerto ortotópico para investigar los efectos de anticuerpos de rata anti-AXL sobre metástasis de carcinoma de próstata humano en ratones atímicos. Células de carcinoma de próstata PC-3-LN se implantaron ortotópicamente en la próstata de ratones NMRI-nu/nu. Los animales fueron aleatorizados en 4 grupos y recibieron 25 mg/kg del anticuerpo de control isotópico 1 D5 o el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7, así como 40 mg/kg de Sutent o 12,5 mg/kg de Taxotere. Después de la necropsia, órganos seleccionados (hígado, bazo, pulmón, fémur y una parte de la columna lumbar) se recogieron y se analizaron con respecto a la presencia de metástasis a través de captación de imágenes de bioluminiscencia. Véase el texto para los detalles. En comparación con el anticuerpo de control isotópico 1 D5, el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7 de la invención redujo la presencia de metástasis del bazo. Es notable que el efecto antimetastásico de 11 B7 en este experimento era más fuerte que el de Sutent.

Figura 16. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de AXL en diferentes enfermedades malignas humanas. 17 tipos de tumores sólidos humanos, cada uno representado por pares de tejido tumoral y tejido no maligno equivalente, se analizaron con respecto a la expresión de AXL mediante inmunohistoquímica. Véase el texto para los detalles. Los resultados se resumen (A), en donde una intensidad de 1 se refiere a una tinción débil en más de 25% de las células inspeccionadas. Se presentan ejemplos de la tinción más intensa en tumores de mamífero y un carcinoma de células en anillo de sello del estómago (B).

Figura 17. Experimentos de ELISA para comparar los efectos de anticuerpos de rata y quiméricos anti-Axl sobre la fosforilación de Axl. Células de cáncer de cuello uterino CaSki se privaron de nutrientes, se preincubaron con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 μ g/ml y 10 μ g/ml de anticuerpo de rata anti-Axl 11 B7 (A) o anticuerpo quimérico anti-Axl ch11 B7 (B), se trataron con o sin 400 ng/ml de mGas6 y se sometieron a lisis. Los lisados se transfirieron a placas de 96 pocillos Maxi-Sorp revestidas con anticuerpo 4G10 anti-fosfotirosina. Posteriormente, las placas se lavaron y se incubaron con 0,5 μ g/ml de anticuerpo de rata anti-Axl 12B7 biotinilado, estreptavidina conjugada a AP y solución de sustrato AttoPhos a fin de recoger las intensidades de fluorescencia. Véase el texto para los detalles. Como se demostró por la disminución dependiente de la concentración de la fosforilación relativa de Axl en la línea celular de cáncer de cuello uterino CaSki, el anticuerpo de rata anti-Axl 11B7 (A) y el anticuerpo quimérico anti-Axl ch11B7 (B) de la invención fueron capaces de bloquear la activación inducida por ligando de la tirosina cinasa receptora Axl hasta un grado similar.

Figura 18. Experimentos de ELISA para comparar los efectos de anticuerpos de rata y quiméricos anti-Axl sobre la fosforilación de Axl. Células de cáncer de cuello uterino CaSki se privaron de nutrientes, se preincubaron con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 μ g/ml y 10 μ g/ml de anticuerpo de rata anti-Axl 11 B7 (A) o anticuerpo quimérico anti-Axl ch11B7 (B), se trataron con o sin 400 ng/ml de mGas6 y se fijaron con formaldehído. Las células se lavaron, se desactivaron y se incubaron con anticuerpo primario para MAP cinasa anti-fosfo-p44/p42 (Thr202/Tyr204), anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP y solución de tetrametilbencidina a fin de medir las intensidades de absorbancia. Véase el texto para los detalles. El anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 (A) y el anticuerpo quimérico anti-Axl ch11B7 (B) de la invención fueron capaces de bloquear la activación inducida por Gas6 de p42/p44 MAP-cinasa en células de cáncer de cuello uterino hasta un grado similar según se indica por la disminución dependiente de la concentración de la fosforilación relativa de p42/p44 MAP-cinasa.

Figura 19. Tinción con TUNEL para investigar el efecto combinatorio de anticuerpos de rata anti-AXL y agentes quimioterapéuticos para vencer la resistencia a fármacos en células de cáncer de ovario humano. Células de cáncer de ovario NCI/ADR-RES humanas se preincubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo de control o el anticuerpo anti-Axl antagonista 11B7 y se coincubaron con doxorubicina en concentraciones finales de 100 μ M, 150 μ M o 200 μ M. Aplicando un estuche disponible comercialmente, se realizó tinción con TUNEL a fin de visualizar y determinar la apoptosis. Véase el texto para los detalles. No se observó tinción con TUNEL, y de ahí tampoco apoptosis, con células de cáncer de ovario NCI/ADR-RES que se trataron con 100 μ M de doxorubicina, independientemente de si las células se habían coincubado con anticuerpo de control o el anticuerpo anti-Axl antagonista 11 B7 (superior). Sin embargo, con una concentración de 150 μ M de doxorubicina, solo se podía detectar una apoptosis muy débil en células cotratadas con anticuerpo de

control, mientras que la coincubación con el anticuerpo anti-Axl antagonista 11 B7 dio como resultado una inducción sustancial de la apoptosis (mitad). Además, en presencia de 200 μM de doxorubicina, la coincubación de células con 11 B7 incrementó significativamente las tasas de apoptosis en comparación con células que se incubaron con anticuerpo para IgG de control (inferior), indicando que el cotratamiento de células tumorales incluso resistentes a múltiples fármacos tanto con agentes quimioterapéuticos como con anticuerpos anti-Axl antagonistas puede ser adecuado para vencer la resistencia a fármacos.

Figura 20. Ensayo en agar blando para investigar el efecto combinatorio de anticuerpos de rata anti-AXL y agentes quimioterapéuticos sobre el crecimiento independiente del anclaje de células de melanoma humano. Células de melanoma C-8161 humanas bien se mantuvieron sin tratar o bien se incubaron con el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7 con una concentración final de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Combinadas con cisplatino a las concentraciones indicadas, las células embebidas en agar se dejaron crecer sobre una capa de agar de fondo al 0,7% durante 5 días. Teñida con MTT, la superficie de colonias se midió a continuación. Véase el texto para los detalles. Se muestran los números absolutos que reflejan la superficie global de colonias (A) y la inhibición relativa (B) calculada sobre la base de estos datos. En comparación con las células de control no tratadas, la incubación con cisplatino condujo al retardo del crecimiento de colonias de un modo dependiente de la dosis. En línea con el efecto inhibitorio de 11 B7 solo en el intervalo de 30%, la combinación con anticuerpo anti-Axl antagonista 11 B7 daba como resultado un efecto inhibitorio significativamente potenciado del cisplatino sobre el crecimiento en agar blando de células de melanoma C-8161, particularmente a concentraciones inferiores de cisplatino.

Además, la presente invención se explicará mediante los siguientes ejemplos y las figuras de los dibujos adjuntas.

Ejemplos

Comentario general

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos efectuados y los resultados alcanzados, se proporcionan solamente con propósitos ilustrativos y no se debe considerar que limiten la presente invención.

Ejemplo 1. Generación de fibroblastos Rati que sobreexpresan AXL como inmunógeno y fibroblastos NIH3T3 que sobreexpresan AXL como sistema modélico experimental

La frecuencia codificante de longitud completa para el transcrito de tirosina cinasa receptora AXL humana variante 1 según la secuencia de referencia del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (NM_021913) se subclonó en pLXSN a través de elementos de reconocimiento de flanqueo para las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, dando como resultado el vector de expresión retroviral pLXS N-hAXL.

Para la generación de anticuerpos que se unen específicamente a tirosina cinasa receptora AXL humana, fibroblastos Rati que sobreexpresan establemente AXL humana se generaron mediante transferencia de genes retrovirales. En resumen, 3×10^5 células Phoenix-E se cribaron sobre platos de cultivo de 60 mm y se transfectaron con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vector pLXSN o pLXSN-hAXL usando el método de precipitación del fosfato cálcico. Después de 24 h, el medio se reemplazó por medio reciente en el que se incubaron células Phoenix-E durante 4 h. Los sobrenadantes de células Phoenix-E que liberaron virus ecotrófico pLXSN o pLXSN-hAXL se recogieron y se usaron para la incubación de células Rati subconfluentes (2×10^5 células por plato de 6 cm) durante 3 h en presencia de Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Simultáneamente, células Phoenix-E se reincubaron con medio reciente que, después de otras 3 h, se usó para una segunda infección de los fibroblastos Rati en presencia de Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Asimismo, se realizó una tercera infección. Después de cambiar el medio, se inició la selección de células Rati con G418. Habitualmente, se recogieron clones estables después de una selección durante 21 días.

Un conjunto de clones estables se propagó y se cuantificó con respecto a la expresión de AXL humana localizada en la membrana mediante análisis por FACS. En detalles, 1×10^5 células se recogieron con EDTA 10 mM en PBS, se lavaron una vez con tampón de FACS (PBS, FCS al 3%, azida al 0,4%) y se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se centrifugaron durante 3 min. a 1.000 rpm para retirar el sobrenadante y se resuspendieron con anticuerpo primario de ratón anti-AXL MAB154 (R&D Systems, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo durante 1 h, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se resuspendieron en 100 μl /pocillo de anticuerpo secundario de burro contra inmunoglobulinas de ratón conjugado a PE (Jackson) diluido 1:50 en tampón de FACS. Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo y en la oscuridad durante 30 min., se lavaron dos veces con tampón de FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

La Figura 1 muestra el análisis por FACS de la población Rati-Mock policlonal infectada establemente con vector vacío pLXSN y Rati-AXL cl.2 infectadas establemente con pLXSN-hAXL, y demuestra la sobreexpresión de AXL sobre la superficie celular en este clon representativo.

Adicionalmente, a fin de generar un sistema modélico celular adecuado con propósitos experimentales, fibroblastos NIH3T3 que sobreexpresan establemente AXL se generaron análogamente a procedimientos descritos para Rati. En resumen, 3×10^5 células Phoenix-E se sembraron sobre platos de cultivo de 60 mm y se transfectaron con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$

de vector pLXSN o cDNA de pLXSN-AXL usando el método del fosfato cálcico. Después de 24 h, el medio se reemplazó por medio reciente en el que células Phoenix-E se incubaron durante 4 h. Los sobrenadantes de células Phoenix-E que liberaron virus ecotróficos pLXSN o pLXSN-hAXL se recogieron y se usaron para la incubación de células NIH3T3 subconfluentes (2×10^5 células por plato de 6 cm) durante 3 h en presencia de Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Simultáneamente, células Phoenix-E se reincubaron con medio reciente que, después de otras 3 h, se usó para una segunda infección de los fibroblastos NIH3T3 en presencia de Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Asimismo, se realizó un tercer ciclo de infección. Después de cambiar el medio, se inició la selección de células NIH3T3 con G418. Habitualmente, se recogieron clones estables después de una selección durante 21 días.

Un conjunto de clones estables se propagó y se cuantificó con respecto a la expresión de AXL localizada en la membrana mediante análisis por FACS. En detalle, 1×10^5 células se recogieron con EDTA 10 mM en PBS, se lavaron una vez con tampón de FACS (PBS, FCS al 3%, azida al 0,4%) y se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se centrifugaron durante 3 min. a 1.000 rpm para retirar el sobrenadante y se resuspendieron con anticuerpo primario de ratón anti-AXL MAB154 (R&D Systems, 3 µg/ml). Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo durante 1 h, se lavaron dos veces con tampón de FACS y se resuspendieron en 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario de burro contra inmunoglobulinas de ratón conjugado a PE (Jackson) diluido 1:50 en tampón de FACS. Las suspensiones celulares se incubaron sobre hielo y en la oscuridad durante 30 min., se lavaron dos veces con tampón de FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

La Figura 2 muestra el análisis por FACS de la población NIH3T3-Mock policlonal infectada establemente con vector vacío pLXSN y NIH3T3-AXL cl.7 infectadas establemente con pLXSN-hAXL, y demuestra la sobreexpresión de AXL sobre la superficie celular de este clon representativo.

Ejemplo 2. Generación de anticuerpos monoclonales de rata anti-AXL

Se produjeron anticuerpos de rata anti-AXL monoclonales mediante inyección de aproximadamente 10×10^6 células congeladas de Rat1-AXL cl.2 tanto i.p. como subcutáneamente en ratas Lou/C o Long Evans. Después de un intervalo de 8 semanas, una dosis de recuerdo final se administró i.p. y subcutáneamente 3 d antes de la fusión. La fusión de la línea celular de mieloma P3X63-Ag8.653 con las células inmunitarias del bazo de rata se realizó según procedimientos estándar y dio 105 hibridomas. Después de 2 semanas, los primeros sobrenadantes procedentes de los hibridomas se recogieron y se probaron en un cribado por FACS primario con respecto a la unión a fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 frente a células de control NIH3T3-Mock. Los clones positivos con respecto a la unión a AXL se cultivaron adicionalmente. A partir de un sobrenadante de 50 ml de estos clones, los anticuerpos se purificaron y se analizaron de nuevo con respecto a la unión específica a AXL en fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 frente a células de control NIH3T3-Mock. Los anticuerpos purificados que se unieron específicamente a fibroblastos NIH3T3-AXL cl. 7 pero no a células de control NIH3T3-Mock se probaron adicionalmente en ELISA de fosforilación de Akt-cinasa y se realizaron ELISA para determinar el isotipo. Para la purificación de anticuerpos de rata, los sobrenadantes se centrifugaron durante 20 minutos a 5.000 g y posteriormente se filtraron estérilmente. Se añadieron 500 µl de proteína G Sepharose FF y se incubaron a 4°C durante al menos 1 h en una rueda de centrifugación. La Sepharose se precipitó, el sobrenadante se descartó y la matriz de proteína G se lavó dos veces con PBS antes de la elución de la proteína utilizando tampón de citrato (100 mM) pH 2,1. Las fracciones de elución se volvieron a tamponar inmediatamente hasta pH neutro al añadir Tris 1 M pH 8,0 y se dializaron frente a PBS.

De los anticuerpos oligoclonales probados, 91 se unieron específicamente a fibroblastos NIH3T3-AXL cl. 7 pero no a células de control NIH3T3-Mock, 9 inhibieron la fosforilación de Akt inducida por Gas6 en las mismas células, mientras que 71 estimularon la fosforilación de Akt. Cuatro anticuerpos antagonistas (I11B7, I10D12, I6E7 y III11D5, en los siguientes ejemplos denominados 11B7, 10D12, 6E7 y 11 D5, respectivamente), dos anticuerpos agonistas (I11D7 y III2A1; en los siguientes ejemplos denominados 11 D7 y 2A1) y un anticuerpo de control (III1D5; en los siguientes ejemplos denominado 1 D5) se crioconservaron y se subclonaron.

| Nº | clon | subclase | Control de NIH3T3-pLXSN desplazado por FACS | NIH3T3-hAXL-C18 desplazadas por FACS |
|----|--------|----------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | I 1B11 | 2a | 0,8 | 53,8 |
| 2 | I 1C8 | Ig.M/2a | 0,9 | 55,0 |
| 3 | I 2F3 | 2a | 0,8 | 52,4 |
| 4 | I 6E7 | 2a | 1,8 | 62,3 |
| 5 | I 7E6 | 2a | 0,8 | 47,1 |
| 6 | I 7G1 | G1 | 0,7 | 32,0 |
| 7 | I 7G11 | G1 | 3,5 | 8,8 |

ES 2 556 214 T3

(continuación)

| Nº | clon | subclase | Control de NIH3T3-pLXSN desplazado por FACS | NIH3T3-hAXL-C18 desplazadas por FACS |
|----|----------|-----------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| 8 | I 8E5 | G1 | 1 | 33,0 |
| 9 | I 9H3 | G1 | 0,5 | 40,4 |
| 10 | I 10a10 | IgM/2a | 0,5 | 32,6 |
| 11 | I 10D9 | 2a | 0,7 | 47,4 |
| 12 | I 10D12 | G1 | 0,5 | 37,5 |
| 13 | I 11B7 | IgM/G1/2c | 0,6 | 36,2 |
| 14 | I 11D7 | IqM/2a | 0,7 | 9,6 |
| 15 | I 12B7 | 2a/2c | 0,8 | 43,6 |
| 16 | II 2B8 | IgM/G1 | 0,6 | 2,5 |
| 17 | II 2D4 | 2a | 0,8 | 46,5 |
| 18 | II 6a5 | G1 | 0,6 | 13,1 |
| 19 | II 8a8 | 2a | 0,6 | 34,6 |
| 20 | III 1a10 | 2a | 1,4 | 54,5 |
| 21 | III 1B1 | 2a | 7,5 | 24,6 |
| 22 | III 1B3 | IgM/2a | 1,1 | 53,3 |
| 23 | III 1B6 | 2b | 1,1 | 15,3 |
| 24 | III 1B11 | 2b | 1,1 | 11,1 |
| 25 | III 1C3 | 2b | 1,0 | 24,2 |
| 26 | III 1C10 | - | 1,1 | 22,1 |
| 27 | III 1D2 | IgM/2b | 3,0 | 26,6 |
| 28 | III 1D5 | 2a | 1,5 | 8,9 |
| 29 | III 1D7 | 2b | 1,0 | 17,3 |
| 30 | III 1D11 | - | 1,1 | 10,9 |
| 31 | III 1D12 | 2b | 1,0 | 7,7 |
| 32 | III 1E7 | - | 1,1 | 81,4 |
| 33 | III 1E11 | G1/2a | 1,2 | 44,0 |
| 34 | III 1 F2 | G1 | 1,2 | 42,2 |
| 35 | III 1F3 | 2b | 1,1 | 9,0 |
| 36 | III 1G2 | - | 1,0 | 30,5 |
| 37 | III 1G9 | 2ª | 1,3 | 89,2 |
| 38 | III 1G11 | - | 1,1 | 54,7 |
| 39 | III 1G12 | - | 1,1 | 59,4 |

ES 2 556 214 T3

(continuación)

| Nº | clon | subclase | Control de NIH3T3-pLXSN desplazado por FACS | NIH3T3-hAXL-C18 desplazadas por FACS |
|----|----------|----------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| 40 | III 1H4 | IgM/2b | 1,0 | 20,0 |
| 41 | III 1H8 | 2a/2b | 1,0 | 10,1 |
| 42 | III 1H9 | 2b | 0,9 | 13,6 |
| 43 | III 2A1 | 2a | 1,0 | 36,0 |
| 44 | III 2A2 | 2b | 1,0 | 10,5 |
| 45 | III 2A4 | 2b | 1,2 | 11,8 |
| 46 | III 2B1 | 2b I | 0,9 | 16,0 |
| 47 | III 2B6 | 2a/2b | 1,0 | 39,7 |
| 48 | III 2B8 | 2a | 1,0 | 53,3 |
| 49 | III 2B10 | 2b | 1,1 | 10,6 |
| 50 | III 2C12 | 2a/2b | 1,0 | 11,2 |
| 51 | III 2D1 | 2a/2b | 1,0 | 42,0 |
| 52 | III 2D3 | 2b | 0,9 | 17,8 |
| 53 | III 2D8 | 2a | 1,4 | 109,7 |
| 54 | III 2D12 | 2b | 1,8 | 16,0 |
| 55 | III 2E11 | 2b | 1,0 | 14,8 |
| 56 | III 2G4 | - | 1,0 | 8,5 |
| 57 | III 2H7 | - | 1,0 | 91,2 |
| 58 | III 3A1 | 2a | 1,5 | 82,5 |
| 59 | III 3A2 | 2b | 1,0 | 7,4 |
| 60 | III 3A3 | IgM/G1 | 2,0 | 49,6 |
| 61 | III 3B2 | - | 1,0 | 11,3 |
| 62 | III 3B3 | 2b | 0,8 | 12,4 |
| 63 | III 3B4 | IgM | 1,2 | 98,0 |
| 64 | III 3B5 | IgM/2b | 1,6 | 74,0 |
| 65 | III 3B7 | 2b | 1,8 | 13,4 |
| 66 | III 3B10 | 2a | 1,1 | 70,6 |
| 67 | III 3C3 | - | 1,3 | 45,7 |
| 68 | III 3C4 | - | 1,4 | 15,2 |
| 69 | III 3C10 | 2a | 15,2 | 83,3 |
| 70 | III 3C12 | 2b | 1,2 | 41,8 |
| 71 | III 3D2 | 2b | 0,9 | 11,8 |

ES 2 556 214 T3

(continuación)

| Nº | clon | subclase | Control de NIH3T3-pLXSN desplazado por FACS | NIH3T3-hAXL-C18 desplazadas por FACS |
|-----|----------|-----------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| 72 | III 3D3 | 2a | 1,0 | 54,5 |
| 73 | III 3E1 | - | 1,2 | 49,7 |
| 74 | III 3E3 | 2a/2b | 1,3 | 16,0 |
| 75 | III 3E5 | 2a | 1,1 | 56,4 |
| 76 | III 3F1 | 2b | 1,0 | 9,8 |
| 77 | III 3G1 | 2a | 1,2 | 57,8 |
| 78 | III 3G3 | 2a | 1,1 | 45,7 |
| 79 | III 3G6 | 2a | 1,1 | 55,9 |
| 80 | III 3H4 | 2b | 1,0 | 43,3 |
| 81 | III 3H5 | 2b | 1,2 | 11,8 |
| 82 | III 4A4 | IgM | 1,3 | 8,5 |
| 83 | III 4A5 | 2a | 1,9 | 32,8 |
| 84 | III 4A6 | 2a | 2,5 | 10,4 |
| 85 | III 4B1 | 2b | 1,9 | 10,2 |
| 86 | III 4B5 | 2b | 1,6 | 6,4 |
| 87 | III 4B6 | 2a | 1,9 | 56,8 |
| 88 | III 4B9 | IgM/2b/2c | 1,7 | 16,6 |
| 89 | III 4B11 | 2a | 1,2 | 58,1 |
| 90 | III 4C2 | - | 1,6 | 7,4 |
| 91 | III 4C8 | 2a | 12,8 | 21,3 |
| 92 | III 4D1 | - | 1,6 | 7,9 |
| 93 | III 4D9 | - | 1,1 | 31,2 |
| 94 | III 4D10 | 2a | 3,8 | 7,5 |
| 95 | III 4E11 | 2b | 1,5 | 7,6 |
| 96 | III 4F6 | - | 1,2 | 5,5 |
| 97 | III 4F8 | 2a | 1,2 | 51,3 |
| 98 | III 4F11 | IgM | 1,2 | 12,9 |
| 99 | III 4F12 | 2a | 1,1 | 52,6 |
| 100 | III 4G2 | 2a | 1,0 | 52,4 |
| 101 | III 4G11 | IgM/2b | 1,1 | 8,9 |
| 102 | III 4H4 | 2b | 3,1 | 61,3 |
| 103 | III 4H5 | 2a | 2,7 | 20,0 |

(continuación)

| Nº | clon | subclase | Control de NIH3T3-pLXSN desplazado por FACS | NIH3T3-hAXL-C18 desplazadas por FACS |
|-----|----------|----------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| 104 | III 4H10 | IqM/2a | 1,3 | 49,2 |
| 105 | III 4H11 | IgM | 3,3 | 124,0 |

5 Ejemplo 3. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención no reaccionan cruzadamente con AXL de ratón u otros miembros de la familia de AXL, Mer y Sky humanas

10 Este ejemplo se dirigió a la reactividad cruzada de anticuerpos de rata anti-AXL de la invención con AXL de ratón y mono cynomolgus así como con los otros miembros de la familia de AXL humana, Mer humana y Sky humana. Después de la subclonación de la secuencia codificante de AXL de ratón y mono así como Mer y Sky humanas en pcDNA3, cada construcción de expresión se transfirió en fibroblastos HEK293T. La capacidad de los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención para unirse a estas proteínas se probó mediante análisis por FACS.

3 A. Clonación de AXL de ratón

15 En el presente estudio, se generó la construcción de expresión de AXL de ratón pcDNA3-mAXL. La secuencia codificante de longitud completa de AXL de ratón se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usando cDNA de corazón de ratón (Ambion) como plantilla y cebadores apropiados según la secuencia de referencia de the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (NM_009465) de AXL de ratón. La secuencia de longitud completa que codifica AXL de ratón estaba cubierta de ese modo por dos fragmentos de PCR solapados, un fragmento 5' y un fragmento 3'. Los cebadores para la amplificación de estos fragmentos fueron como sigue:

Cebador directo MOUSE1 para el fragmento 5' que porta una secuencia de reconocimiento con *EcoRI*:

20 5'- GCG AAT TCG CCA CCA TGG GCA GGG TCC CGC TGG CCT G- 3'

Cebador inverso MOUSE2 para el fragmento 5':

5'- CAG CCG AGG TAT AGG CTG TCA CAG ACA CAG TCA G- 3'

Cebador directo MOUSE3 para el fragmento 3':

5'- GCA CCC TGT TAG GGT ACC GGC TGG CAT ATC- 3'

25 Cebador inverso MOUSE4 para el fragmento 3' que porta una secuencia de reconocimiento con *NotI*:

5'- ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGG CTC CGT CCT CCT GCC CTG- 3'

30 El fragmento 5' se digirió con *EcoRI* y *BstEII*, el fragmento 3' se digirió con *BstEII* y *NotI*, y pcDNA3 se escindió con *EcoRI* y *NotI*. Se realizó una ligación de tres factores de los fragmentos aislados y purificados y se transformaron en células bacterianas DH5 α . Se recogió una sola colonia y se hizo crecer en presencia de ampicilina. Usando un estuche de purificación de plásmidos disponible comercialmente (Qiagen), el vector de expresión de AXL de ratón pcDNA3-mAXL se purificó y se verificó la transfección transitoria posterior de la secuencia en células HEK293T.

3 B. Clonación de AXL de mono cynomolgus

35 En el presente estudio, se generó la construcción de expresión de AXL de mono cynomolgus pcDNA3-cyAXL. La secuencia codificante de longitud completa de AXL de mono cynomolgus se amplificó por PCR usando cDNA preparado a partir de tejido cerebral de mono cynomolgus como plantilla. Puesto que la secuencia de nucleótidos del AXL de mono cynomolgus no estaba disponible, se diseñaron cebadores respectivos suponiendo una homología significativa con AXL humana. La secuencia de longitud completa que codifica AXL de mono cynomolgus estaba cubierta de ese modo por dos fragmentos de PCR solapados, un fragmento 5' y un fragmento 3'. Los cebadores para la amplificación de estos fragmentos fueron como sigue:

40 Cebador directo CYNO1 para el fragmento 5' que porta una secuencia de reconocimiento con *EcoRI*:

5'- CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGT GGC GGT GCC CCA G- 3'

Cebador inverso CYNO2 para el fragmento 5':

5'- CTC TGA CCT CGT GCA GAT GGC AAT CTT CAT C- 3'

ES 2 556 214 T3

Cebador directo CYNO3 para el fragmento 3':

5'- GTG GCC GCT GCC TGT GTC CTC ATC- 3'

Cebador inverso CYNO4 para el fragmento 3' que porta una secuencia de reconocimiento con *NotI*:

5'- ATA AGA ATG C GG CCG CTC AGG CAC CAT CCT CCT GCC CTG - 3'

- 5 El fragmento 5' se digirió con *EcoRI* y *DraIII*, el fragmento 3' se digirió con *DraIII* y *NotI*, y pcDNA3 se escindió con *EcoRI* y *NotI*. Se realizó una ligación de tres factores de los fragmentos aislados u purificados y se transformaron en células bacterianas DH5 α . Se recogió una sola colonia y se hizo crecer en presencia de ampicilina. Usando un estuche de purificación de plásmidos disponible comercialmente (Qiagen), se purificó el vector de expresión de mono cynomolgus pcDNA3-cyAXL, y se verificó la transfección transitoria posterior de la secuencia en células HEK293T. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del mono cynomolgus son como sigue:
- 10

Secuencia de nucleótidos:

ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGGATGGGCAGGGTCCCGCTGGCCTGGTG
CTTGGCGCTGTGCGGCTGGGTGTGCATGGCCCCAGGGGCACACAGG
CTGAAGAAAGTCCTTTCGTGGGTAACCCAGGGAATATCACAGGTGCC
GGGACTCACGGGCACCCTTCGGTGTGAGCTCCAGGTTCCAGGGAGAG
CCCCCGAGGTACACTGGCTTCGGGACGGACAGATCCTGGAGCTCGC
GGACAGTACCCAGACCCAGGTGCCCTGGGTGAAGATGAGCAGGATGA
CTGGATAGTGGTCAGCCAGCTCAGAATCGCCTCCCTACAGCTTTCGGAC
GCGGGACAGTACCAGTGTTTGGTGTTCCTGGGACATCAGAACTTCGTGT
CCCAGCCTGGCTACGTAGGGCTGGAGGGCTTACCTTACTTCCTGGAGG
AGCCTGAGGACAGGACTGTGGCCGCCAACACCCCTTCAACCTGAGCT
GCCAAGCCAGGGACCCCCAGAGCCCGTGGACCTACTCTGGCTCCAG
GATGCTGTCCCCCTGGCCACAGCTCCAGGTCATGGTCCCCAGCGCAAC
CTGCATGTTCCAGGGCTGAACAAGACATCCTCTTTCCTGCGAAGCCC
ATAACGCCAAGGGAGTCACCACATCCCGCACGGCCACCATCACAGTGC
TCCCCAGCAGCCCCGTAACCTCCATCTGGTCTCCCGCCAACCCACGG
AGCTGGAGGTGGCTTGGACTCCAGGCCTGAGCGGCATCTACCCCCTGA
CCCACTGCACCCTGCAGGCTGTGCTGTCAGACGATGGGATGGGCATCC
AGGCGGGAGAACCAGACCCCCAGAGGAGCCCCTCACCTTGCAAGCAT
CTGTGCCCCCCCACCAGCTTCGGCTGGGCAGCCTCCATCCTCACACCC
CTTATCACATCCGTGTGGCATGCACCAGCAGCCAGGGCCCCCTCATCCT
GGACACACTGGCTTCCTGTGGAGACGCCGGAGGGAGTGCCCCTGGGC
CCCCCTGAGAACATTAGTGCCACGCGGAATGGGAGCCAGGCCTTCGTG
CATTGGCAGGAGCCCCGGGCGCCCCTGCAGGGTACCCTGTTAGGGTA
CCGGCTGGCGTATCAAGGCCAGGACACCCAGAGGTGCTAATGGACAT
AGGGCTAAGGCAAGAGGTGACCCTGGAGCTGCAGGGGGACGGGTCTG
TGTCCAATCTGACAGTGTGTGTGGCAGCCTACACTGCTGCTGGGGATG
GACCCTGGAGCCTCCAGTACCCTGGAGGCCTGGCGCCCAGGGCAA
GCACAGCCAGTCCACCAGCTGGTGAAGGAACTTCAGCTCCTGCCTTC
TCGTGGCCCTGGTGGTATATACTGCTAGGAGCAGTCGTGGCCGCTGCC
TGTGTCCTCATCTTGGCTCTCTTCCTTGTCCACCGGCGAAAGAAGGAGA
CCCGTTATGGAGAAGTGTTTCGAGCCAACAGTGGAAAGAGGTGAACTGG
TAGTCAGGTACCGCGTGCGCAAGTCCTACAGTCGCCGGACCACTGAAG

CTACCTTGAACAGCCTGGGCATCAGTGAAGAGCTGAAGGAGAAGCTGC
GGGATGTGATGGTGGACCGGCACAAGGTGGCCCTGGGGAAGACTCTG
GGAGAAGGAGAGTTTGGAGCCGTGATGGAAGGCCAGCTCAACCAGGA
CGACTCCATCCTCAAGGTGGCTGTGAAGACAATGAAGATTGCCATCTGC
ACAAGGTCAGAGCTGGAGGATTTCTGAGTGAAGCAGTCTGCATGAAG
GAATTCGACCATCCCAATGTCATGAGGCTCATCGGTGTCTGTTTCCAGG
GTTCTGAACGAGAGAGCTTTCCAGCACCTGTGGTCATCTTACCTTTCAT
GAAGCATGGAGACCTACACAGCTTCCTCCTCTATTCCCGGCTTGGGGA
CCAGCCAGTGTACCTGCCCACTCAGATGCTAGTGAAGTTCATGGCGGA
CATCGCCAGTGGCATGGAATATCTGAGTACCAAGAGATTCATACACCGG
GACCTGGCGGCCAGGAACTGCATGCTGAATGAGAACATGTCCGTGTGT
GTGGCGGACTTCGGGCTCTCCAAGAAGATCTACAACGGGGACTACTAC
CGCCAGGGACGTATCGCCAAGATGCCAGTCAAGTGGATTGCCATTGAG
AGTCTAGCTGACCGTGTCTACACGAGCAAGAGTGATGTGTGGTCCTTC
GGGGTGACAATGTGGGAGATTGCCACAAGAGGCCAAACCCCATATCCA
GGCGTGGAGAACAGCGAGATTTATGACTATCTGCGCCAGGGAAATCGC
CTGAAGCAGCCTGCGGACTGTCTGGATGGACTGTATGCCTTGATGTCG
CGGTGCTGGGAGCTAAATCCCCAGGACCGGCCAAGTTTTACAGAGCTG
CGGGAAGATTTGGAGAACACACTGAAGGCCTTGCCTCCTGCCCAGGAG
CCTGACGAAATCCTCTATGTCAACATGGATGAAGGTGGAGGTTATCCTG
AACCTCCCGGCGCTGCTGGAGGAGCTGACCCCCCAACCCAGCTAGACC
CTAAGGATTCCTGTAGCTGCCTCACTTCGGCTGAGGTCCATCCTGCTGG
ACGCTATGTCCTCTGCCCTTCCACAGCCCCTAGCCCCGCTCAGCCTGC
TGATAGGGGCTCCCCAGCAGCCCCAGGGCAGGAGGATGGTGCC

Secuencia de aminoácidos:

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGAR
 GLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDQGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIV
 VSQRLIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRT
 VAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPGLNK
 TSSFSCEAHNAKGVTTSTRATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLS
 GIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQLRLGSLHP
 HTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFV
 HWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLLELQGDGGSVSN
 LTVCVAAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKETSAPAFSWPW
 WYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEP TVERGELVVRYRVRK
 SYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEG
 QLNQDDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF
 QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADI
 ASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQG
 RIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVWSFGVTMWEIATRGTQTPYPGVENSEI
 YDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLK
 ALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQLDPKDSCSCLTSA
 EVHPAGRYVLC PSTAPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

3 C. Clonación de Mer humana

- 5 En el presente estudio, se generó la construcción de expresión de Mer humana pcDNA3-hMer. La secuencia codificante de longitud completa de Mer humana se obtuvo a través de la escisión del vector pCMV6-XL4-Mer humana (Origene nº TC116132) con *EcoRI* y *XbaI*. Después de la digestión de pcDNA3 con las mismas endonucleasas de restricción, ambos fragmentos se ligaron para generar pcDNA3-hMer. A fin de introducir una
- 10 secuencia de consenso de Kozak, la región 5' de la secuencia codificante de Mer humana en pcDNA3-hMer se amplificó por PCR usando cebadores apropiados según la secuencia de referencia de NCBI (NM_006343) de Mer humana. Los cebadores para la amplificación de este fragmento fueron como sigue:

Cebador directo MER1 que porta una secuencia de reconocimiento con *EcoRI* y la secuencia de consenso de Kozak:

5'-CGG AAT TCG CCA CCA TGG GGC CGG CCC CGC TGC CGC-3'

- 15 Cebador inverso MER2 para el fragmento 5':

5'-TCG GCT GCC ATT CTG GCC AAC TTC C-3'

- 20 El producto de PCR y pcDNA3-hMer se digirieron con *EcoRI* y *EcoRV* y se ligaron para generar pcDNA3-Kozak-hMer, en el que la secuencia codificante de Mer humana de longitud completa está precedida por una secuencia de consenso de Kozak. Transformada en células bacterianas DH5 α , se recogió una sola colonia y se hizo crecer en presencia de ampicilina. Usando un estuche de purificación de plásmidos disponible comercialmente (Qiagen), el vector de expresión pcDNA3-Kozak-hMer se purificó, y se verificó la transfección transitoria posterior de la secuencia en células HEK293T.

3 D. Clonación de Sky humana

En el presente estudio, se generó la construcción de expresión de Sky humana pcDNA3-hSky. La secuencia codificante de longitud completa de Sky humana se amplificó por PCR usando el vector pCMV6-XL4-Sky humana (Origene n° MG1044_A02) como plantilla y cebadores apropiados según la secuencia de referencia de NCBI (NM_006293) de Sky humana. Los cebadores para la amplificación fueron como sigue:

Cebador directo SKY1 que porta una secuencia de reconocimiento con *EcoRI*:

5'-CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGC TGA GGC GGA GC-3'

Cebador inverso SKY2 que porta una secuencia de reconocimiento con *XhoI*:

5'-GCC CTC GAG CTA ACA GCT ACT GTG TGG CAG TAG-3'

10 El producto de PCR y pcDNA3 se digirieron con *EcoRI* y *XhoI* y se ligaron para generar el vector de expresión pcDNA3-hSky. Transformada en células bacterianas DH5 α , se recogió una sola colonia y se hizo crecer en presencia de ampicilina. Usando un estuche de purificación de plásmidos disponible comercialmente (Qiagen), el vector de expresión pcDNA3-hSky se purificó, y se verificó la transfección transitoria posterior de la secuencia en células HEK293T.

15 3 E. Transfección y expresión de AXL de ratón, AXL de mono cynomolgus, Mer humana y Sky humana

Para la expresión transitoria de AXL de ratón, AXL de mono cynomolgus, Mer humana o Sky humana, células HEK293T se transfectaron transitoriamente con vector vacío pcDNA3, pcDNA3-hAXL, pcDNA3mAXL, pcDNA3-cyAXL, pcDNA3-hMer o pcDNA3-hSky aplicando el método del fosfato cálcico. En resumen, antes de la transfección, 3 x 10⁶ células HEK293T en 16 ml de medio se sembraron en un plato de cultivo celular y tisular de 15 cm y se hicieron crecer en CO₂ al 7% y 37°C durante 30 h. 32 mg de DNA de la construcción de expresión respectiva o el vector vacío en 720 μ l de ddH₂O se mezclaron con CaCl₂ 2,5 M y 2 x BBS (pH 6,96) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min. Las soluciones se añadieron suavemente a los cultivos celulares y se incubaron en CO₂ al 3% y 37°C durante 8 h. A continuación, el medio se reemplazó por medio de crecimiento reciente y las células se cultivaron en CO₂ al 7% y 37°C durante 24 h.

25 3 F. Análisis por FACS para probar la reactividad cruzada de anticuerpos de rata anti-AXL

Para el análisis por FACS, 2 x 10⁵ células se recogieron con EDTA 10 mM en PBS, se lavaron una vez con tampón de FACS (PBS, FCS al 3%, azida al 0,4%) y se sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Para retirar el sobrenadante, las placas se centrifugaron durante 3 min. a 1.000 rpm y las células se resuspendieron en 10 μ g/ml de anticuerpo de control isotípico 1 D5 así como soluciones de anticuerpos primarios anti-AXL 11 D5, 11 B7, 10D12, 6E7, 2A1, 11 D7 y 12B7 (100 μ l/pocillo). Después de la incubación sobre hielo durante 1 h, las células se lavaron dos veces con tampón de FACS refrigerado y se resuspendieron con anticuerpo secundario de burro contra inmunoglobulinas de rata conjugado a PE (Jackson) diluido 1:50 en tampón de FACS (100 μ l/pocillo) o anticuerpo secundario de burro contra inmunoglobulinas de ratón conjugado a PE para control. Protegidas de la luz, las células se incubaron sobre hielo durante 30 min., se lavaron dos veces con tampón de FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

La Figura 3 muestra resultados representativos de este experimento. Con la excepción de 12B7 que muestra una reactividad cruzada moderada con AXL de ratón así como Mer y Sky humanas, ninguno de los otros anticuerpos anti-AXL de la invención reaccionó cruzadamente con estas moléculas. En contraste, todos los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención probados reaccionaron cruzadamente con AXL de mono cynomolgus.

40 Ejemplo 4. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención inhiben la fosforilación de AXL inducida por ligando in vitro

Se realizaron experimentos de ELISA a fin de investigar si los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención son capaces de bloquear la activación de AXL mediada por ligando Gas6. La activación de AXL mediada por Gas6 se detectó por un incremento en la fosforilación de tirosina receptora. En resumen, el día 1, 3 x 10⁴ células por pocillo se sembraron en medio de crecimiento normal en placas de 96 pocillos de fondo plano. A día siguiente, el medio de crecimiento se reemplazó por medio libre de suero para privar a las células de nutrientes durante la noche a lo largo de 24 h. También durante la noche, placas de 96 pocillos negras Maxi-Sorp (Nunc) se revistieron con anticuerpo de ratón antifosfotirosina 4G10 en 2 μ g/ml de PBS y 4°C. El día 3, la solución de anticuerpo 4G10 se retiró y los pocillos Maxi-Sorp se bloquearon con PBS, BSA al 0,5%, durante al menos 4 h a temperatura ambiente. En paralelo, se preincubaron células con 10 μ g/ml del anticuerpo de control de ratón 72A1 así como los anticuerpos de rata anti-AXL 2A1, 11 D7, 11 D5, 11 B7, 6E7 y 10D12 durante 1 h a 37°C y a continuación se trataron con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) durante 10 min. a 37°C. A continuación, el medio se retiró rápidamente y las células se sometieron a lisis en tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM DTA, glicerina al 10% y Triton X-100 al 1%) complementado con inhibidores de fosfatasa y proteasa (Na₄P₂O₇ 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, ortovanadato 1 mM, NaF 1 mM y aprotinina al 0,5%) durante 30 min. sobre hielo. Mientras

tanto, el tampón de bloqueo se retiró y las placas Maxi-Sorp se lavaron 6 veces con tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,05%), antes de que los lisados se transfirieran y se incubaran durante la noche a 4°C. Después de que las placas se lavaran 6 veces con tampón de lavado el día 4, los pocillos se incubaron con anticuerpo de rata anti-AXL 12B7 biotinilado en 0,5 µg/ml de PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con tampón y se añadió a cada pocillo estreptavidina conjugada a AP (Chemicon nº SA110) diluida 1:4.000 en PBS y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, los pocillos se lavaron 6 veces con tampón de lavado y se añadió solución de sustrato AttoPhos (Roche nº 11681982). Usando un lector de placas Victor (Perkin Elmer), la fluorescencia de cada pocillo se recogió a una longitud de onda de excitación de 430 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm.

La Figura 4 muestra resultados representativos de este experimento para fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 (A) y células de cáncer de pulmón NCI-H292 (B). Los anticuerpos de rata anti-AXL 11 B7, 11 D5, 6E7 y 10D12 de la invención fueron capaces de bloquear o reducir la activación de AXL mediada por ligando como se indica por una disminución de la fosforilación, y así se consideran anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, los anticuerpos de rata anti-AXL 2A1 y 11 D7 de la invención estimulan la activación basal de AXL como se indica por un incremento en la fosforilación, no reducen significativamente la activación de AXL mediada por ligando, y por lo tanto se consideran anticuerpos anti-AXL agonistas. Se observaron efectos similares con el mismo conjunto de anticuerpos en las líneas celulares de cáncer de pulmón CaLu-1 y CaLu-6, las líneas celulares de cáncer de mama Hs578T y MDA-MB-231, la línea celular de cáncer de próstata PC-3, la línea celular de cáncer de páncreas PANC-1, la línea celular de melanoma C-8161, las líneas celulares de cáncer ovárico SkOV-3 y SkOV-8, la línea celular de glioblastoma SF-126, la línea celular de cáncer de cuello uterino CaSki, así como las líneas celulares de cáncer gástrico Hs746T y MKN-1.

Ejemplo 5. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención inhiben la fosforilación de p42/p44 MAP-cinasa inducida por ligando in vitro

A continuación, se realizaron experimentos de ELISA a fin de investigar si los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención son capaces de bloquear la activación mediada por ligando Gas6 de p42/p44 MAP-cinasa. La activación de MAPcinasa p42/p44 mediada por Gas6 se detectó por un incremento en la fosforilación de proteína (Thr202/Tyr204). En resumen, el primer día, 2×10^4 células por pocillo se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano. Al día siguiente, el medio de crecimiento normal se reemplazó por medio libre de suero para privar a las células de alimento durante 36 h. Posteriormente, las células se preincubaron con 10 µg/ml del anticuerpo de control isotópico 1 D5 así como los anticuerpos de rata anti-AXL 11 D5, 11 B7 y 2A1 durante 1 h a 37°C y a continuación se trataron con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) durante 10 min. a 37°C. El medio se retiró rápidamente y las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS (pH 7,5) durante 30 min. a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se retiró y las células se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS, 0,1% de Tween 20). Las células se desactivaron con H₂O₂ al 1%, NaN₃ al 0,1% en tampón de lavado y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de desactivación se retiró y las células se lavaron dos veces con tampón de lavado y se bloquearon con PBS, BSA al 0,5%, durante 4 h a 4°C. Anticuerpo primario anti-fosfo-MAP cinasa p42/p44 (Thr202/Tyr204) (policlonal de conejo; Cell Signaling nº 9101) diluido 1:500 en PBS, BSA al 0,5%, EDTA 5 mM se añadió durante la noche a 4°C. El día 4, la solución de anticuerpo se retiró y la placa se lavó 3 veces con tampón de lavado. A continuación, anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP (Dianova nº 111-036-045) diluido 1:2.500 en PBS, BSA al 0,5%, se añadió a cada pocillo y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con tampón de lavado y dos veces con PBS durante 5 min. cada uno. Se añadió tetrametilbencidina (TMB, Calbiochem) y se comprobó a 620 nm. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de HCl 250 mM y la absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm usando un lector de placas Vmax (Thermo Lab Systems).

La Figura 5 muestra resultados representativos de este experimento para la línea celular de cáncer de cuello uterino CaSki. Los anticuerpos de rata anti-AXL 11 B7 y 11 D5 de la invención fueron capaces de reducir la activación de p42/p44 MAP-cinasa mediada por ligando como se indica por una disminución de la fosforilación, y así se consideran anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, el anticuerpo de rata anti-AXL 2A1 de la invención estimula la activación basal de p42/p44 MAP-cinasa como se indica por un incremento en la fosforilación, no reduce la activación de p42/p44 MAP-cinasa mediada por ligando, y por lo tanto se considera un anticuerpo anti-AXL agonista. Se observaron efectos similares con el mismo conjunto de anticuerpos en la línea celular de cáncer de mama Hs578T y la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H292.

Ejemplo 6. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención inhiben la fosforilación de Akt inducida por ligando in vitro

Por otra parte, se realizaron experimentos de ELISA a fin de investigar si los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención son capaces de bloquear la activación de cinasa Akt mediada por ligando Gas6. La activación de cinasa Akt mediada por Gas6 se detectó por un incremento en la fosforilación de proteína (Ser473). En resumen, el día 1, 2×10^4 células por pocillo se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano. Al día siguiente, el medio de crecimiento normal se reemplazó por medio reducido en suero (DMEM, FCS al 0,5% para fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7) o libre de suero (para líneas celulares de cáncer) para privar a las células de nutrientes durante 36 h. Posteriormente, las células se preincubaron con 10 µg/ml del anticuerpo de control isotópico 1 D5 así como los anticuerpos de rata anti-AXL 11 D5, 11 B7 y 2A1 durante 1 h a 37°C y a continuación se trataron con o sin 400 ng/ml

de Gas6 (R&D Systems) durante 10 min. a 37°C. El medio se retiró rápidamente y las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS (pH 7,5) durante 30 min. a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se retiró y las células se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,1%). Las células se desactivaron con H₂O₂ al 1%, NaN₃ al 0,1% en tampón de lavado y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. Acto seguido, la solución de desactivación se retiró y las células se lavaron dos veces con tampón de lavado y se bloquearon con PBS, BSA al 0,5%, durante 4 h a 4°C. Anticuerpo primario antifosfo-Akt (Ser473) (policlonal de conejo; Cell Signaling n° 9271) diluido 1:500 en PBS, BSA al 0,5%, EDTA 5 mM, se añadió durante la noche a 4°C. El día 4, la solución de anticuerpo se retiró y la placa se lavó 3 veces con tampón de lavado. A continuación, anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP (Dianova n° 111-036-045) diluido 1:2.500 en PBS, BSA al 0,5%, se añadió a cada pocillo y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con tampón de lavado y dos veces con PBS durante 5 min. cada uno. Se añadió tetrametilbencidina (TMB, Calbiochem) y se comprobó a 620 nm. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de HCl 250 nM y la absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm usando un lector de placas Vmax (Thermo Lab Systems).

La Figura 6 muestra resultados representativos de este experimento para fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 (A) y células de cáncer de pulmón CaLa-1 (B). Los anticuerpos de rata anti-AXL 11 B7 y 11 D5 de la invención fueron capaces de bloquear o reducir la activación de cinasa Akt mediada por ligando como se indica por una disminución de la fosforilación, y así se consideran anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, el anticuerpo de rata anti-AXL 2A1 de la invención estimula la activación basal de cinasa Akt como se indica por un incremento en la fosforilación, no reduce la activación de cinasa Akt mediada por ligando, y por lo tanto se considera un anticuerpo anti-AXL agonista. Se observaron efectos similar con el mismo conjunto de anticuerpos en la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H292, las líneas celulares de cáncer de mama Hs578T y MDA-MB-231, la línea celular de cáncer de próstata PC-3, la línea celular de cáncer de páncreas PANC-1, la línea celular de melanoma C-8161, las líneas celulares de cáncer ovárico SkOV-3 y SkOV- 8, la línea celular de vejiga urinaria TCC-Sup, así como la línea celular de fibrosarcoma HT1080.

Ejemplo 7. Los anticuerpos de rata y quiméricos anti-AXL de la invención inhiben la fosforilación de Akt inducida por ligando in vitro hasta un grado similar

Se generaron derivados quiméricos de los anticuerpos de rata anti-AXL 11B7 y 11D5 como parte de esta invención (véase posteriormente). A fin de investigar si los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención y los correspondientes anticuerpos quiméricos anti-AXL de la invención eran capaces de bloquear la activación mediada por el ligando Gas6 de la cinasa Akt en fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 hasta un grado similar, se realizaron experimentos de ELISA. La inhibición de cinasa Akt mediada por anticuerpo se detectó por una disminución en la fosforilación de proteína (Ser473). En resumen, el día 1, 2×10^4 células por pocillo se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano. Al día siguiente, el medio de crecimiento normal se reemplazó por medio reducido en suero (DMEM, FCS al 0,5%) para privar a las células de nutrientes durante 36 h. Posteriormente, las células se preincubaron con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml y 1 µg/ml de anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 o anticuerpo quimérico anti-AXL ch11B7, así como 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml de anticuerpo de rata anti-AXL 11 D5 o anticuerpo quimérico anti-AXL ch11 D5 durante 1 h a 37°C y a continuación se trataron con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) durante 10 min. a 37°C. El medio se retiró rápidamente y las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS (pH 7,5) durante 30 min. a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se retiró y las células se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,1%). Las células se desactivaron con H₂O₂ al 1%, NaN₃ al 0,1% en tampón de lavado y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. Acto seguido, la solución de desactivación se retiró y las células se lavaron dos veces con tampón de lavado y se bloquearon con PBS, BSA al 0,5% durante 4 h a 4°C. Anticuerpo antifosfo-Akt (Ser473) (policlonal de conejo; Cell Signaling n° 9271) diluido 1:500 en PBS, BSA al 0,5%, 5 mM EDTA se añadió durante la noche a 4°C. El día 4, la solución de anticuerpo se retiró y la placa se lavó 3 veces con tampón de lavado. A continuación, anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP (Dianova n° 111-036-045) diluido 1:2.500 en PBS, BSA al 0,5%, se añadió a cada pocillo y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con tampón de lavado y dos veces con PBS durante 5 min. cada una. Se añadió tetrametilbencidina (TMB, Calbiochem) y se comprobó a 620 nm. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de HCl 250 nM y la absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm usando un lector de placas Vmax (Thermo Lab Systems).

La Figura 7 demostró que el anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 y el anticuerpo quimérico anti-AXL ch11B7 de la invención así como el anticuerpo de rata anti-AXL 11 D5 y el anticuerpo quimérico anti-AXL ch11 D5 de la invención fueron capaces de inhibir la activación de cinasa Akt mediada por ligando hasta un grado similar como se indica por una disminución de la fosforilación. Así, en comparación con sus homólogos de rata respectivos, los anticuerpos quiméricos anti-AXL ch11 B7 y ch11D5 mantuvieron la actividad.

Ejemplo 8. Los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas de la invención compiten entre sí por el mismo epítipo o epítipos estructuralmente relacionados y no comparten sitios de unión con anticuerpos de rata anti-AXL agonistas de la invención

Se examinó si los anticuerpos anti-AXL de la invención compiten entre sí por epítipos de unión similares en el dominio AXL-ECD. Por lo tanto, la unión de anticuerpos anti-AXL biotinilados a placas revestidas con el dominio

AXL-ECD preincubadas con anticuerpos anti-AXL se determinó en un ELISA competitivo. En resumen, 30 µg de anticuerpo de control isotípico 1 D5 así como anticuerpos de rata anti-AXL 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7 y 2A1 se biotinilaron con Sulfo-NHS-Biotin (Pierce nº 21217) según las instrucciones del fabricante y se purificaron usando columnas Micro-BioSpin P6 SSC (BIO-RAD nº 732-6200). El día 1, placas Maxi-Sorp de 96 pocillos negras (Nunc) se revistieron con 100 µl/pocillo de 1 µg/ml de AXL-ECD humano (R&D Systems nº 154-AL) en PBS durante la noche a 4°C. El día 2, las placas Maxi-Sorp revestidas se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS, BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,05%) durante 2 h a temperatura ambiente (250 µl/pocillo), y posteriormente se incubaron con PBS o anticuerpo de control isotípico 1 D5 no biotinilado así como anticuerpos de rata anti-AXL 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7 o 2A1 no biotinilados en 10 µg/ml en tampón de bloqueo (100 µl/pocillo) durante 1 h a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpo se retiraron rápidamente sin lavar y se añadieron 100 µl/pocillo de PBS o anticuerpo de control isotípico 1 D5 biotinilado así como anticuerpos de rata anti-AXL 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7 o 2A1 biotinilados en 0,5 µg/ml en tampón de bloqueo y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente. Después de lavar 6 veces con tampón de lavado (PBS, TWEEN-20 al 0,1%), se añadieron 80 µl/pocillo de estreptavidina conjugada a AP (Chemicom nº SA110) diluida 1:4.000 en tampón de bloqueo, se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo 6 veces con tampón de lavado y finalmente se lavaron una vez con PBS. Para la detección, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de sustrato Attophos (Roche nº 11681982). Usando un lector de placas Victor (Perkin Elmer), se recogió la fluorescencia de cada pocillo a una longitud de onda de excitación de 430 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm.

La Figura 8 muestra resultados representativos de este análisis. Los anticuerpos anti-AXL antagonistas 11 B7, 11 D5, 6E7 y 10D12 de la invención compiten entre sí por el mismo epítipo o epítopos estructuralmente adyacentes. Los dos anticuerpos agonistas 11 D7 y 2A1 de la invención reconocen individualmente diferentes epítopos y por lo tanto no son mutuamente exclusivos. Por otra parte, 11 D7 y 2A1 no compiten con los anticuerpos antagonistas por la unión al AXL-ECD. El anticuerpo de control 1 D5 no se unió a AXL-ECD.

Ejemplo 9. Los anticuerpos de rata y quiméricos anti-AXL de la invención inhiben la migración y la proliferación de células de cáncer de pulmón in vitro

Para examinar las velocidades de migración y proliferación de diferentes células y condiciones de cultivo, se han empleado desde hace muchos años ensayos de curación de heridas/raspado. Estos ensayos implican generalmente hacer crecer en primer lugar una monocapa celular confluyente. A continuación, se rompe una pequeña superficie y un grupo de células se destruye o desplaza al trazar una línea a través de la capa con, por ejemplo, una punta de pipeta. A continuación, el hueco abierto se inspecciona a lo largo del tiempo a medida que las células se mueven hacia y rellenan la superficie dañada ("curación"). En resumen, $1,5 \times 10^6$ células de cáncer de pulmón NCI-H292 se sembraron por pocillo de un plato de 12 pocillos y se cultivaron en medio de crecimiento normal (RPMI, FCS al 10%). Después de 8 h, las células se enjuagaron con PBS y se privaron de nutrientes en medio bajo en suero (RPMI, FCS al 0,5%) durante la noche a lo largo de 24 h. Usando la punta de una pipeta de 200 µl estéril, se rasparon tres heridas uniformes separadas por pocillo a través de las monocapas de células NCI-H292 confluentes. Las células se enjuagaron suavemente con PBS y se incubaron con medio bajo en suero (RPMI, FCS al 0,5%) que no contenía aditivo y contenía 10 µg/ml del anticuerpo de control isotípico 1 D5, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11 D5, 11B7, 6E7 o 10D12, los anticuerpos quiméricos anti-AXL chn11D5 IgG2 y chn11B7 IgG2, los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 2A1 y 11 D7 así como 10 µg/ml de Erbitux o Sutent 5 µM para comparación. Se permitió que las células migraran a la superficie de clarificación durante 24 h, se lavaron una vez con PBS y se fijaron con metanol (100%) enfriado con hielo a -20°C. Después de que las células se tiñeran con violeta cristal (0,5% en metanol al 20%), se enjuagaron con agua y se secan durante la noche, se tomaron fotografías de las heridas.

La Figura 9 muestra resultados representativos de este experimento para células de cáncer de pulmón NCI-H292. En comparación con el anticuerpo de control isotípico, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11D5, 11B7, 6E7 y 10D12 de la invención, así como los anticuerpos quiméricos anti-AXL chn11 D5 IgG2 y chn11 B7 IgG2 de la invención redujeron la repoblación de la superficie clarificada, mientras que los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 2A1 y 11 D7 de la invención condujeron a un cierre completo de la herida. Se observaron resultados similares con el mismo conjunto de anticuerpos con la línea celular de cáncer ovárico SkOv-3 o la línea celular de cáncer gástrico MKN-1.

Ejemplo 10. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención inhiben la migración inducida por ligando de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 in vitro

Se realizaron experimentos de transmigración a fin de investigar si los anticuerpos de la invención bloquean la migración celular. Con este propósito, en la mañana del día 1, células NIH3T3-AXL cl.7 se sembraron en un plato de 15 cm en medio de crecimiento normal, que por la tarde se reemplazó por medio reducido en suero (DMEM, FCS al 0,5%) a fin de privar a las células de nutrientes durante 36 h. Al día siguiente, una placa de 36 pocillos FluoroBlock (Becton Dickinson nº 351164, tamaño de poro 8 µm) se revistió con 10 µg de colágeno l/ml de ácido acético 0,1 M durante la noche a 37°C. El día 3, el medio reducido en suero (DMEM, FCS al 0,5%) se reemplazó por medio libre de suero (DMEM, FCS al 0%, BSA al 0,1%) durante otras 4 h. Las células se recogieron con EDTA 10 mM en PBS y se preincubaron con anticuerpos de rata anti-AXL 4A6, 11 B7 o 2A1 a una densidad celular de 4×10^5 células/ml y una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml durante 45 min. A continuación, 50 µl de suspensión celular (20.000

células) por pocillo se pusieron en la cámara superior de la placa de 96 pocillos FluoroBlock, se usaron 225 µl de medio (DMEM, FCS al 0%, BSA al 0,1%) con o sin 400 ng/ml de Gas6 de ratón (R&D Systems) por pocillo en la cámara inferior. Se dejó que las células migraran durante 7 h a 37°C y acto seguido se tiñeron con calceína-AM (Molecular Probes nº C3099) 4,2 µM en PBS, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM durante 1 h a 37°C. Usando un lector de placas Victor (Perkin Elmer), se midió la fluorescencia de cada pocillo a una longitud de onda de 530 nm.

La Figura 10 muestra que el anticuerpo anti-AXL antagonista 11 B7 de la invención redujo la migración tanto basal como inducida por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl. 7, mientras que el anticuerpo de rata anti-AXL agonista 2A1 de la invención incrementó la migración inducida por ligando y, en particular, basal de las células NIH3T3-AXL cl.7. El anticuerpo 4A6 no afectó a la migración celular.

Ejemplo 11. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención inhiben la proliferación inducida por ligando de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 in vitro

Se efectuaron experimentos in vitro a fin de determinar la capacidad de los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención para inhibir la proliferación celular inducida por Gas6. Con este propósito, se sembraron 2.500 fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 por pocillo en medio que contenía FCS en placas de 96 pocillos durante la noche. Al día siguiente, las células se privaron de nutrientes en medio reducido en suero (DMEM, FCS al 0,5%) durante 10 h y posteriormente se preincubaron con 20 µg/ml del anticuerpo de control de ratón 72A1, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11D5 y 11B7, así como el anticuerpo agonista 2A1 en DMEM, FCS al 0,5%, durante 1 h a 37°C. Las células se trataron con o sin 400 ng/ml de Gas6 de ratón (R&D Systems) al añadir ligando directamente a la solución de anticuerpo, y a continuación se dejaron crecer durante 96 h. Se añadió AlamarBlue™ (BIOSOURCE nº DAL1100) y se incubó a 37°C en la oscuridad. La absorbancia se midió a 590 nm cada 30 min. Los datos se tomaron 4 h después de la adición de AlamarBlue™.

La Figura 11 muestra resultados representativos de este experimento. Los anticuerpos anti-AXL antagonistas 11 D5 y 11 B7 de la invención bloquearon la proliferación inducida por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7, mientras que el anticuerpo de rata anti-AXL agonista 2A1 de la invención incrementó la proliferación inducida por ligando y, en particular, basal de células NIH3T3-AXL cl.7.

Ejemplo 12. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención inhiben la antiapoptosis mediada por ligando de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 privados de suero in vitro

La inducción de la apoptosis y la activación de caspasas pueden resultar de una variedad de estímulos, incluyendo la retirada de factores de crecimiento, la exposición a agentes quimioterapéuticos o radiación, o el inicio del proceso de muerte celular mediado por el receptor Fas/Apo-1. Se ha mostrado que la interacción Gas6-AXL está implicada en la protección de una gama de tipos celulares de la apoptosis, incluyendo fibroblastos NIH3T3 privados de suero (Goruppi y cols., 1996, Oncogene 12, 471-480) o células endoteliales pulmonares (Healy y cols., 2001, Am. J. Physiol., 280, 1273-1281). En el presente ejemplo, se examinó si los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención interfieren con la antiapoptosis mediada por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 privados de suero, y así inducen apoptosis. De ese modo, las tasas de apoptosis se determinaron mediante la medida de la actividad de caspasa-3/7 celular. Con este propósito, células NIH3T3-AXL cl.7 se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^3$ células por pocillo en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente (100 µl/pocillo). Al día siguiente, el medio de crecimiento normal se reemplazó por medio reducido en suero (DMEM, FCS al 0,5%) para privar a las células de nutrientes durante la noche a lo largo de 24 h. Al día siguiente, se prepararon soluciones de anticuerpo del anticuerpo de control isotópico 1D5, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11B7 y 11 D5, así como los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 11 D7 y 2A1 en 80 µg/ml en DMEM, FCS al 0%, BSA al 0,01%. Las células se lavaron con PBS, se cubrieron con 60 µl de DMEM, FCS al 0%, BSA al 0,01%, y se añadieron 10 µl de la solución de anticuerpo respectiva. Después de 1 h de incubación a 37°C, se añadieron 10 µl de DMEM, FCS al 0%, BSA al 0,01%, con o sin 3,2 µg/ml de Gas6 de ratón (R&D Systems) (las concentraciones finales de anticuerpo y Gas6 eran 10 µg/ml y 400 ng/ml, respectivamente), y las células se incubaron a 37°C durante otras 5 h. Las siguientes etapas se refieren al boletín técnico del Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega, G7791). En resumen, las placas de cultivo se retiraron de la incubadora y se dejó que se equilibraran a temperatura ambiente durante 20 min. Se descongelaron 60 µl de sustrato Apo-ONE y 6 ml de tampón se descongelaron, se combinaron y se añadieron a las muestras (75 µl/pocillo). El contenido de los pocillos se batió suavemente durante 30 s, y, protegido de la luz, se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Usando un lector de placas Victor (Perkin Elmer), se midió la fluorescencia de cada pocillo a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

La Figura 12 muestra resultados representativos de este experimento. En comparación con el anticuerpo de control isotópico, los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11 B7 y 11D5 de la invención redujeron la antiapoptosis mediada por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 privados de suero, y así indujeron la apoptosis. En contraste, los anticuerpos de rata anti-AXL agonistas 2A1 y 11 D7 de la invención indujeron fuertemente la antiapoptosis de células NIH3T3-AXL cl.7 privadas de suero independientemente de la ausencia o presencia de Gas6, y por lo tanto inhibieron la apoptosis.

Ejemplo 13. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención inhiben la angiogénesis celular basada en esferoides in vitro

La AXL es un regulador clave de múltiples comportamientos angiogénicos incluyendo la migración, la proliferación y la formación de tubos endoteliales in vitro (Holland y cols., Cancer Res: 65, 9294-9303, 2005). Por lo tanto, se probaron los efectos inhibidores de los anticuerpos monoclonales de rata anti-AXL 11B7 y 11D5 de la invención sobre la ramificación de vasos inducida por VEGF-A de esferoides de HUVEC. Se siguieron los experimentos en la modificación del protocolo publicado originalmente (Korff y Augustin: J Cell Sci 112: 3249-58, 1999). En resumen, se prepararon esferoides según se describe (Korff y Augustin: J Cell Biol 143: 1341-52, 1998) pipeteando 500 células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en una gota colgante sobre platos de plástico para permitir la agregación del esferoide durante la noche. A continuación, se sembraron 50 esferoides de HUVEC en 0,9 ml de una solución de colágeno (2 mg/ml) y se pipetearon en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos para permitir la polimerización. Concentraciones decrecientes de los anticuerpos de rata anti-AXL 11B7 y 11D5 (1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M) se mezclaron directamente en la solución de colágeno antes de la polimerización, mientras el factor de crecimiento VEGF-A (concentración final 25 ng/ml) se añadió durante 30 min. pipeteando 100 μ l de una dilución de trabajo concentrada 10 veces sobre el gel polimerizado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y se fijaron al añadir paraformaldehído al 4%. La intensidad de ramificación de esferoides de HUVEC se cuantificó mediante un sistema de análisis de imágenes que determina la longitud de ramificación acumulativa por esferoide usando un microscopio invertido y el programa de captación de imágenes digital Analysis 3.2 (Soft imaging system, Münster, Alemania). La media de la longitud de ramificación acumulativa de 10 esferoides seleccionados aleatoriamente se analizó como un punto de datos individual.

La Figura 13 muestra los resultados de este experimento. Los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11 B7 (A) y 11 D5 (B) de la invención inhibieron la ramificación de HUVEC estimulada por VEGF en el ensayo de angiogénesis basado en esferoides de un modo dependiente de la dosis. Aunque el tratamiento con la concentración más alta de 11 B7 redujo la ramificación de HUVEC hasta niveles basales, la inhibición con la concentración más alta de 11 D5 no era tan eficaz (cuadro izquierdo). La ramificación de HUVEC se inhibió con valores de IC_{50} de $9,8 \times 10^{-8}$ M y $7,0 \times 10^{-7}$ M para 11B7 y 11 D5, respectivamente (cuadro derecho).

Ejemplo 14. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención reducen el crecimiento de carcinoma de próstata humano en ratones atímicos

La eficacia antitumoral de los anticuerpos terapéuticos se evalúa a menudo en estudios de tumores de xenoinjertos humanos. En estos sistemas modélicos, los tumores humanos crecen como xenoinjertos en ratones inmunocomprometidos y la eficacia terapéutica se mide por el grado de inhibición del crecimiento del tumor. El objetivo de este estudio fue evaluar si el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7 de la invención interfiere con el crecimiento de tumores de células de cáncer de próstata humano en ratones atímicos. En resumen, el día 0, ratones NMRI^{nu/nu} macho de 7-8 semanas de edad (peso aproximado: 30 g después de la aclimatación) se anestesiaron con isoflurano al 1,5-2,0 por ciento en volumen con un caudal de oxígeno 2 l/min., y 1×10^6 células PC-3-LN en 25 μ l de PBS se implantaron ortotópicamente en la próstata. Las células PC-3-LN se derivan de la línea celular de carcinoma de próstata PC-3 que estaba infectada con un retrovirus que codifica una proteína de fusión de luciferasa-neomicina. Por lo tanto, el comienzo del crecimiento del tumor y el avance del crecimiento del tumor eran medibles a través de captación de imágenes de bioluminiscencia in vivo. Con este propósito, se inyectó luciferina intraperitonealmente (i.p.) en los ratones y la emisión de luz se midió 10 min. después de la inyección usando un sistema de captación de imágenes de bioluminiscencia NightOWL LB 981 (Berthold Technologies, Alemania). Antes del primer tratamiento, los ratones se aleatorizaron y se realizaron pruebas estadísticas para asegurar uniformidad en los volúmenes del tumor iniciales (media, mediana y desviación estándar) a través de los grupos de tratamiento de 10 animales cada uno. El día 8, todos los tratamientos comenzaron y se continuaron hasta el día 34, seguido por necropsia el día 35. 25 mg/kg del anticuerpo de control isotípico 1 D5 y el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11B7 se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) 3 veces por semana (lunes, miércoles, viernes) en animales del grupo 1 y 2, respectivamente. Los animales del grupo 3 recibieron oralmente (p.o.) 40 mg/kg de Sutent una vez al día. Los animales del grupo 4 recibieron tres inyecciones intravenosas (i.v.) con 12,5 mg/kg de Taxotere espaciadas 4 días entre sí. Se da posteriormente una visión de conjunto de los grupos de tratamiento.

| Grupo | | Tratamiento | Aplicación | | Numero de Animales |
|-------|----------|-------------|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| | | | Vía | Esquema | |
| 1 | 1D5 | 25 mg/kg | i.p. | 3 veces por semana (lunes, miércoles, viernes) empezando un día después de la aleatorización ²⁾ | 10 |
| 2 | 11B7 | 25 mg/kg | i.p. | 3 veces por semana (lunes, miércoles, viernes) empezando un día después de la aleatorización ²⁾ | 10 |
| 5 | Sutent | 40 mg/kg | p.o. | diaria empezando un día después de la aleatorización ²⁾ | 10 |
| 6 | Taxotere | 12,5 mg/kg | i.v. | 3 dosis deparadas 4 días empezando un día después de la aleatorización | 10 |

La Figura 14 muestra los resultados de este experimento. En comparación con el anticuerpo de control isotópico 1 D5, el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7 de la invención redujo el crecimiento global de tumores de próstata PC-3-LN en ratones atómicos.

5 Ejemplo 15. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención inhiben metástasis de carcinoma de próstata humano

En el mismo experimento que el descrito bajo "Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención reducen el crecimiento de carcinoma de próstata humano en ratones atómicos", se analizó la relocalización de células tumorales PC-3-LN a otros órganos (metástasis) después de la necropsia para evaluar los efectos antimetastásicos del anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7 de la invención. Con este propósito, órganos seleccionados (hígado, bazo, pulmones, fémur, parte de la columna lumbar) se recogieron después de la necropsia, se homogeneizaron y se complementaron con luciferina. Posteriormente, se midió la emisión de luz usando un sistema de captación de imágenes de bioluminiscencia NightOWL LB 981 (Berthold Technologies, Alemania).

La Figura 15 muestra los resultados de este experimento para el análisis de bazos. En comparación con el anticuerpo de control isotópico 1 D5, el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7 de la invención redujo la presencia de metástasis de bazo. Es notable que el efecto antimetastásico de 11 B7 en este experimento era más fuerte que el de Sutent. Se obtuvieron observaciones similares para metástasis de hígado, pulmón, fémur y columna lumbar.

Ejemplo 16. La AXL se expresa predominantemente en tejido tumoral en lugar de tejido normal adyacente

En este estudio, se analizó histoquímicamente la expresión de AXL en 17 enfermedades malignas humanas diferentes sobre tejidos embebidos en parafina fijados con formalina en un formato de multiserie de tejidos. Para cada tipo de tumor, se examinaron pares de tejido tumoral y tejido no maligno equivalente. En resumen, el tejido se fijó durante de 16 a 20 h en formalina tamponada neutra al 4% y se embebió en parafina. Para la construcción de una microserie de tejidos (TMA) de 60 centros, fue elegido por un patólogo un bocado de tejido sano y un bocado de tejido tumoral correspondiente de cada caso. Se generó una TMA de 96 centros con bocados de tejido de control normal (tres de cada tipo de tejido) de acuerdo con las directrices de la FDA. Cada bocado tenía 1,5 mm de diámetro.

Con un microtomo, se cortaron secciones de 2-4 μm de bloques de tejido seleccionados, se montaron sobre portaobjetos de vidrio silanizados (Sigma) y se secaron a 60°C durante 30 min. y 38°C durante la noche. Las secciones se desparafinaron mediante incubación en un baño de xileno durante 5 min. dos veces, en acetona durante 5 min. dos veces y finalmente en agua destilada durante 5 min. Se realizó un pretratamiento térmico de las secciones en tampón de citrato 10 mM, pH 6,0, en una olla de vapor durante 30 min., seguido por lavado en agua destilada. La peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación con una solución recientemente preparada de H₂O₂ al 0,3% en metanol durante 20 min. a temperatura ambiente, seguido por lavado con agua destilada y PBS durante 5 min. cada uno. Las secciones se incubaron con anticuerpo caprino anti-AXL humana policlonal (Santa Cruz SC-1096) durante 60 min. (dilución 1:20 en TBST) a temperatura ambiente. Después de tres lavados en TBST, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario de conejo contra inmunoglobulinas de cabra biotinilado (Dianova, dilución 1:200 en TBST) durante 45 min. a temperatura ambiente. Después de lavar como anteriormente, las secciones se incubaron con estreptavidina/HRP (DAKO, dilución 1:300 en TBST) durante 30 min. a temperatura ambiente, seguido por lavado como anteriormente. La tinción se consiguió con solución de DAB (DAKO; dilución 1:50 en tampón de sustrato) durante 10 min. a temperatura ambiente. Finalmente, los portaobjetos se lavaron con agua, se tiñeron por contraste con hematoxilina de Harris y se cubrieron con un portaobjetos de vidrio. Las secciones de control se incubaron con anticuerpo de control para IgG de cabra (R&D) en lugar de anticuerpo primario anti-AXL.

La Figura 16 resume los resultados de este análisis sobre la expresión de AXL en 17 tumores sólidos humanos diferentes y tejido no maligno correspondiente (A). Entre todos los casos cribados para cada indicación, no se detectó expresión marcada en el linfoma folicular, el cáncer de próstata (excepto para células individuales) y en el cáncer de riñón. El melanoma y los tumores de células de Merkel mostraron una expresión de AXL muy baja. Se observó una expresión débil en unos pocos tumores del pulmón, principalmente adenocarcinomas. Los tumores de esófago y de Barrett, los tumores ováricos, colónicos y pancreáticos así como los tumores de hígado (carcinoma hepatocelular) mostraron una tinción débil en aproximadamente 30% de los casos. Los tumores de cabeza y cuello mostraron una tinción de débil a moderada en aproximadamente 40% de los tumores. Se detectó una tinción de débil a moderada en de 60% a 100% de los tumores analizados de la mama, el cuello uterino, la vejiga urinaria, el tiroides y el estómago. La tinción más intensa se observó en tumores de mamífero y en un carcinoma de células en anillo de sello del estómago (B). Los tejidos no malignos básicamente no mostraron tinción específica excepto los procedentes de los túbulos del riñón que a veces mostraron tinción débil sobre el fondo.

Ejemplos 17: Estructura y características de anticuerpos anti-AXL

17 A. Secuencias de nucleótidos de dominios variables de anticuerpos de rata

15 Dominios variables de anticuerpos de rata anti-AXL se clonaron a partir de células de hibridoma. Se preparó RNA utilizando el estuche de extracción de RNA RNeasy (RNeasy midi-kit, Qiagen). Se preparó cDNA que codifica los genes del anticuerpo usando el estuche 5' RACE (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

20 Brevemente, se sintetizó cDNA de la primera hebra a partir del total o RNA usando los cebadores GSP1 específicos para el gen y transcriptasa inversa SuperScript™ II. Después de la síntesis del cDNA de la primera hebra, la plantilla de mRNA original se retira mediante tratamiento con la mezcla de RNasa. A continuación, una cola homopolimérica se añade al extremo 3' del cDNA. La amplificación por PCR se efectúa usando DNA polimerasa de Taq, un cebador interno específico para el gen (GSP2) que se hibrida a un sitio situado dentro de la molécula de cDNA y un cebador de anclaje proporcionado con el estuche. Después de la amplificación, los productos de RACE 5' se clonaron en el vector pLXSN-ESK para la secuenciación. Para facilitar la clonación, el cebador de anclaje (AP, por sus siglas en inglés) incluyó una secuencia de reconocimiento para Sall, los cebadores GSP2 contenían un sitio XhoI.

Cebador GSP1:

κ_GSP1: GATGGATGCATTGGTGCAGC

nueva_κ_GSP1: ATAGATACAGTTGGTGCAGC

30 pesada_GSP1: CAGGGTCACCATGGAGTTA

Cebador GSP2:

XhoI-hGSP2: CCGCTCGAGCGGGCCAGTGGATAGACAGATGG

XhoI-kGSP2: CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG

Utilización de cebadores GSP para clonar Mab de rata anti-AXL:

35 11B7: κ GSP1; XhoI-kGSP2

pesada GSP1; XhoI-hGSP2

10D12: κ_GSP1, nueva_κ_GSP1; XhoI-kGSP2 pesada GSP1; XhoI-hGSP2

11 D5: nueva_κ_GSP1; XhoI-kGSP2 pesada GSP1; XhoI-hGSP2

17 B. Secuencia de aminoácidos de dominios variables de anticuerpo de rata anti-AXL

40 Las secuencias de los dominios variables de anticuerpos de rata se tradujeron de los genes secuenciados clonados en los vectores pLXSN-ESK. Las secuencias de aminoácidos dadas empiezan en la posición uno del dominio variable. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) requeridas para la unión específica del anticuerpo a su diana se definen según Kabat (Kabat y cols. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición. Publicación NIH N° 91-3242, 1991). La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia dentro de los dominios variables. Regiones CDR de los anticuerpos específicas para anti-AXL se listan en las SEQ ID N°: 13-30. Las CDR individuales incluyen las siguientes posiciones:

CDR-L1: 24-34

CDR-L2: 50-56

CDR-L3: 89-97

CDR-H1: 31-35b

CDR-H2: 50-65

CDR-H3: 95-102

17 C Expresión y purificación de anticuerpos de rata:

Se cultivaron hibridomas en biorreactores Celline CL 1000 (Integra Biosciences) a 37°C, CO₂ al 5-7% usando DMEM que incluía 4,5 g/l de glucosa; glutamina al 1%, piruvato al 1%, Pen/Strep al 1%. El suplemento de FCS es de FCS al 1% para el compartimento de los nutrientes y FCS bajo en IgG al 5% para el compartimento de las células. La recogida y el intercambio de medio se realiza dos veces por semana. Dilución celular 1/1 -> 1/3 dependiendo del crecimiento celular. La productividad se prueba una vez a la semana a través de análisis por SDS-PAGE. Los sobrenadantes se almacenan a -20°C hasta la purificación. La prueba de micoplasmas de cultivos en marcha se realiza una vez a la semana.

5 Los anticuerpos se purifican usando proteína A o G Sepharose FF (GE-Healthcare) a través de un sistema Äkta Explorer 100 (GE-Healthcare). Las columnas se rellenan individualmente para cada purificación. El tamaño de las columnas se ajusta a la productividad esperada y el tamaño de cada partida (habitualmente 50 - 500 mg). Las soluciones que contienen proteína se mantienen sobre hielo o a 4°C siempre que sea posible. Se usan para todo el procedimiento tampones estériles y agua doblemente destilada.

15 Los sobrenadantes se descongelan, se tamponan con TRIS 50 mM, pH 8,5, se centrifugan, se filtran a través de una membrana de 0,22 µm y se cargan a la columna. Después de lavar con 8 volúmenes de columna (CV, por sus siglas en inglés) de PO₄ 50 mM, pH 8,5, el anticuerpo se eluye con 10 CV de glicina 100 mM, pH 3,3. Las fracciones de eluato se retamponan inmediatamente hasta pH neutro al añadir Tris 1 M pH 8,0 1/5 (1 ml de Tris por 4 ml de fracción de eluato) y se analizan por rSDS-PAGE posteriormente. Las fracciones que contienen anticuerpo puro se reúnen, se dializan contra PBS a 4°C y se filtran estérilmente.

20 Los requisitos del sistema tamponador se ajustan según las propiedades individuales de cada anticuerpo. En particular, el anticuerpo para IgG2a de rata 11 D5 se unió a matriz ProteinG 4 FF (GE-Healthcare) y se lavó bajo condiciones de alta salinidad (NaCl 2 M). El anticuerpo de rata IgG1 11 B7 se purificó a través de rProteinA (GE-Healthcare) bajo condiciones de alta salinidad según 11 D5. La elución del anticuerpo se realizó a pH 5,5. El caudal para la purificación del anticuerpo de rata se tiene que mantener bajo para incrementar la eficacia de unión.

25 Como una segunda etapa de purificación, se pueden poner en práctica bien cromatografía de intercambio iónico (bajo condiciones adecuadas individuales) o bien cromatografía preparativa de exclusión por tamaño (PBS, pH 7,4).

El protocolo estándar para el control de calidad de los anticuerpos purificados incluye:

- Análisis en gel de rSDS-PAGE; tñido con Coomassie o plata
- Prueba de BCA (Pierce nº 23227 BCA Protein Assay Kit; patrón de IgG de rata nº 31233)
- 30 • Exclusión por tamaños analítica (Superdex 200 Tricorn 10/300 GL, ~250 mg en 250 µl; 0,5 ml/min, Äkta Explorer 100)
- Prueba de endotoxinas (LAL, Cambrex QCL-1000® Chromogenic LAL Endpoint Assay nº US50-648U)
- Ensayos de actividad basados en células (unión por FACS; pAkt; pAXL)

35 Los anticuerpos purificados se almacenan en PBS, pH 7,4, bajo condiciones estériles a 4°C o -20°C dependiendo de su estabilidad.

17 D. Determinación de la afinidad de anticuerpos mediante análisis de Scatchard por FACS

Células NIH3T3 con sobreexpresión de AXL humana se recogieron mediante incubación con EDTA 10 mM en PBS y se resuspendieron en 6 millones de células por ml en tampón de FACS (PBS, pH 7,4, FCS al 3%, Na₃N al 0,1%). En una placa de microvaloración de fondo redondo, se añadieron 100 µl de suspensión celular a 100 µl de solución de anticuerpo que contiene los anticuerpos 11 B7, 11 D5, ch11B7-IgG2 o ch11D5-IgG2 en concentraciones entre 40 y 0,002 µg/ml (266 y 0,01 nM) en tampón de FACS. Se dejó que la unión de los anticuerpos avanzara durante 2 horas sobre hielo. A continuación, las células se lavaron dos veces con 250 µl de tampón de FACS por pocillo, y se resuspendieron en 200 µl de anticuerpo secundario (anti-rat-PE; Jackson) diluido 1:50 en tampón de FACS. Después de 45 minutos de incubación, las células se lavaron de nuevo dos veces en tampón de FACS y se resuspendieron en 500 µl de PBS para el análisis por FACS. El análisis se llevó a cabo en un Beckman-Coulter

FACS FC500. Para determinar la constante de afinidad aparente K_{Dap} , los valores de fluorescencia medios se representaron frente a la relación de fluorescencia media y la concentración de anticuerpo correspondiente ($[M]$). Los resultados de K_{Dap} calculados de la pendiente inversa de la línea recta se listan posteriormente:

| Clon | Valor de K_D (nM) |
|-------------|---------------------|
| 11B7 | 0,38 |
| ch11B7-IgG2 | 0,6 |
| 11D5 | 0,81 |
| Ch11D5-IgG2 | 0,9 |

5 18. Quimerización de anticuerpos de rata anti-AXL:

Los genes humanos de IgG1/2 de la cadena ligera κ y la cadena pesada humanos se clonaron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de un voluntario humano según se describe posteriormente:

10 Se prepararon PBMC a partir de sangre entera. La sangre se diluyó 1/2,5 en PBS/EDTA 2 mM con 10 U/ml de heparina a TA, se estratificó sobre 15 ml de solución de Biocoll cubierta por un diafragma (35 ml/tubo) [Biocoll de Biochrom nº L6115]. Las muestras se centrifugaron a TA durante 30 min. a 400 x g y el suero (~15 ml) se descarto. La interfase que contenía PBMC se recuperó cuidadosamente usando una pipeta de Pasteur. Las PBMC se lavaron dos veces en PBS/EDTA 2 mM (primer lavado 100 ml, segundo lavado 50 ml) y se hicieron precipitar a 300 x g durante 10 min. La pella celular se resuspendió en RPMI/FCS al 10% (25 ml) y dio $5,5 \times 10^7$ PBMC.

Se preparó RNA a partir de PBMC usando el estuche RNeasy de Qiagen (nº 75142) según las instrucciones del fabricante. El RNA purificado (30 μ g) se almacenó en partes alícuotas a -80°C .

20 Se prepararon cDNA para el anticuerpo IgG γ 1 y 2 así como cadena κ a partir de RNA aislado, mediante RT-PCR, usando Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen nº 18080 - 93) según las instrucciones del fabricante usando los siguientes cebadores:

- 1) RT- γ : GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG
- 2) RT- γ 2: GGG CTT GCC GGC CGT G
- 3) RT- κ : TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG
- 4) 5'Blp: **AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC
ATC GGT**
- 5) 3'Bam(GAG): **AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA
GGG AGA G**
- 6) 5'Bsi: **AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT
CTT CAT**
- 7) 3'Bam(CTT): **AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT
TGA AGC TCT**

25 Los cebadores se disolvieron a 100 μ M. Se realizaron reacciones de RT-PCR usando 2 pmol de oligo RT γ y RT κ , respectivamente, añadiendo 1 μ g de RNA, mezcla de dNTP 10 mM y se calentaron durante 5 min. hasta 65°C . Se añadieron 4 μ l de tampón para la primera hebra, 1 μ l de DTT 0,1 M, 1 μ l de inhibidor de RNasa (40 U/ μ l de Fermentas nº EO0311) y 2 μ l de Superscript III RT, se mezclaron y se incubaron a 50°C durante 1 h seguido por una etapa de desactivación térmica durante 15 min. a 70°C .

30 Se usaron 2 μ l de reacción de la primera hebra para la PCR de la segunda etapa usando polimerasa de Taq (Eurochrom nº EME010001) para dar DNA de doble hebra de dominios constantes del anticuerpo. El cebador 5'Blp y el 3'Bam(GAG) se usaron para amplificar la cadena γ , y se usaron 5'Bsi y 3'Bam(CTT) para amplificar las regiones constantes de la cadena κ usando los siguientes ajustes de PCR:

ES 2 556 214 T3

Amplificación de la cadena κ :

| | |
|------|------------------------|
| 94°C | 120 s |
| 94°C | 30 s |
| 55°C | 30 s |
| 72°C | ciclo de 45 s 35 veces |
| 72°C | 10 min |

Amplificación de la cadena γ :

| | |
|------|------------------------|
| 94°C | 120 s |
| 94°C | 30 s |
| 45°C | 30 s |
| 72°C | ciclo de 60 s 5 veces |
| 94°C | 30 s |
| 50°C | 30 s |
| 72°C | ciclo de 60 s 35 veces |
| 72°C | 10 min. |

- 5 Los productos de PCR se analizaron sobre un gel de agarosa al 2% tamponado con TAE. Se encontraron una única banda de ~350 pb para la cadena ligera κ y una única banda de ~1.000 pb para las cadenas pesadas $\gamma 1$ y $\gamma 2$. Los productos de PCR se purificaron mediante el estuche de extracción en gel Qiagen (QIAGEN, nº 28784) según las instrucciones del fabricante. Para clonar los fragmentos de PCR en el sitio de clonación múltiple del vector pcDNA3 (Invitrogen), el vector pcDNA3 y los fragmentos de PCR se digirieron con las endonucleasas de restricción *Hind*III (5') y *Bam*HI (3'). Los sitios de restricción se codificaron dentro de los cebadores de PCR. Los fragmentos digeridos
- 10 se purificaron usando el estuche de purificación por PCR Qiagen (QIAGEN, 28104), y los DNA que codifican las cadenas $\gamma 1$, $\gamma 2$ y κ se ligaron en el vector pcDNA3 que facilita DNA ligasa de T4 a 16°C durante la noche. La ligasa se desactivó durante 10 min. a 65°C. Los plásmidos de DNA ligados se transformaron directamente en *E. coli* competente para CaCl₂ usando un protocolo estándar y se dispusieron sobre placas LB que contenían ampicilina. Después de la incubación a 37°C durante la noche, se recogieron colonias individuales, se suspendieron en 10 μ l de
- 15 H₂O y se probó mediante PCR si contenían el plásmido que contenía la cadena de anticuerpo respectiva (5 μ l de células suspendidas, polimerasa de Taq, cebador 5B1p y 3Bam(GAG) $\gamma 1/\gamma 2$ y 5Bsi y 3Bam(CTT) para colonias κ :

| | |
|------|------------------------|
| 94°C | 120 s |
| 94°C | 30 s |
| 55°C | 30 s |
| 72°C | ciclo de 60 s 35 veces |
| 72°C | 10 min. |

Las muestras se analizaron sobre agarosa al 1,5% con respecto a productos de PCR. Las colonias que contenían

genes de anticuerpo se seleccionaron para inocular 5 ml de medio LB/ampicilina. Después de la incubación a 37°C durante la noche, se recogieron las *E. coli* y se preparó DNA usando el Qiagen miniprep kit (QIAGEN, nº 12123). Un digesto de control (HindIII, BamHI) mostraba todos los insertos de cadenas κ y γ con el tamaño esperado; las secuencias se verificaron mediante secuenciación de DNA en Medigenomix.

- 5 Los dominios variables de rata se amplificaron mediante PCR a partir del vector pLXSN-ESK y se clonaron en los vectores g1/g2 y k pcDNA3 para dar los anticuerpos quiméricos de longitud completa. Los dominios VI variables se amplificaron con los siguientes cebadores, que contenían un sitio HindIII y BsmI en el extremo 5' y un sitio BsiWI en el extremo 3':

VL-11B7-5': **AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA
GAT GAC CCA GGC TCC**

VL-11B7-3': **AGA TCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG
TGC CTC**

VL-11 D5-5': **AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA
GAT GAC CCA GTC TCC ATC**

VL-11D5-3': **AGA TCG TAC GTT TCA GCT TGG TCC CAG**

- 10 Los dominios VH variables se amplificaron con los siguientes cebadores, que contenían un sitio HindIII y BsmI en el extremo 5' y un sitio BspI en el extremo 3':

VH-11B7/11D5-5': **AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA GGT GCA
GCT TCA GGA GTC AGG**

VH-11B7/11D5-3': **AGA TGC TGA GCT GAC AGT GAC CAT GAC
TCC TTG GCC**

BsiWI para la cadena ligera y el BspI para la cadena pesada son sitios únicos en el extremo 5' de las regiones constantes para permitir la fusión directa con el extremo 3' de los genes de dominios variables.

- 15 Fusionados a la secuencia líder SEQ ID Nº: 69 derivada del vector pLNOH2 (Norderhaug y cols. J. Immunol. Methods 204, 1997; Neuberger EMBO J. 1983; 2 (8): 1373-8,1983), los genes que codifican las cadenas de anticuerpos quiméricos se clonaron en el sistema de vector pCEP para la expresión recombinante. Los genes de la cadena ligera se clonaron NheI (5') y XhoI (3') en pCEP4 (Invitrogen), los genes de la cadena pesada KpnI (5') y XhoI (3') en pCEP-Pu (Kohfeld FEBS Vol 414; (3) 557 y siguientes, 1997).

- 20 Células HEK 293 sembradas sobre placas de 20 x 20 cm se cotransfectaron con 1 μ g/ml de cada plásmido que codifica genes de la cadena ligera y pesada usando el método de transfección con CaPO_4 estándar para la expresión transitoria. Las condiciones de cultivo fueron 37°C, CO_2 al 5% en medio con alto contenido de glucosa DMEM/F12 que contenía FCS con bajo contenido de IgG al 5%, piruvato al 1%, glutamina al 1%, penicilina/estreptomicina al 1%. 24 h después de la transfección, el medio se intercambió por medio reciente. Los sobrenadantes se recogieron cada 2-3 días durante aproximadamente 3 semanas. Los anticuerpos quiméricos se purificaron de aproximadamente 600 ml de sobrenadante utilizando columnas Hitrap rProtein A de 1 ml (GE-Healthcare) bajo condiciones tamponadoras estándar (carga: Tris 50 mM; pH = 8,5, lavado: PO_4 50 mM; pH = 8,5, elución: glicina 100 mM; pH 3,3) como se describe para la purificación de anticuerpos de rata.

Ejemplo 19. Humanización de dominios variables de anticuerpo de rata anti-AXL

- 30 Las regiones variables de rata de los anticuerpos quiméricos se compararon con secuencias de línea germinal de anticuerpo humano a nivel proteínico a través de una búsqueda BLAST de dominios de inmunoglobulina. Se identificó el análogo humano más cercano dentro de los genes V, que además tenía longitudes del bucle de CDR idénticas. Los segmentos D y J asociados se seleccionaron de la base de datos V-BASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) según su homología con las secuencias de rata en un enfoque análogo.

- 35 Para los dominios variables de rata de los anticuerpos 11 B7 y 11D5, se encontraron las siguientes secuencias de la línea germinal que mejor se ajustaban (segmentos V, D y J) y se definieron como marco humano:

VL11B7hum: Vk1-O12 + Jk1

VH11 B7hum: VH4-59 + D4-4 (marco de lectura 3) + JH4

VL11D5hum: Vk1-L1 + Jk4

VH11 D5hum: VH4-59 + D4-4 (marco de lectura 3) + JH4

5 Las secuencias líder para dominios variables humanizados se adoptaron de las secuencias de genes V de la línea germinal asociadas que se seleccionaban. Residuos de CDR de anticuerpos de rata anti-AXL definidos según Kabat (Kabat y cols., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición. Publicación NIH N° 91-3242, 1991) se injertaron en marcos de la línea germinal humanos para especificidad anti-AXL para obtener la versión humanizada final de los anticuerpos anti-AXL hum11 B7 y hum11 D5.

Las secuencias proteínicas de los anticuerpos anti-AXL humanizados hum11 B7 y hum11D5 son como sigue:

10 Las secuencias proteínicas se sometieron a traducción inversa en secuencias de DNA. Las secuencias de DNA se optimizaron por codones para la expresión recombinante en células de mamífero usando la base de datos de uso de codones de Kazusa. Las secuencias de DNA resultantes para los anticuerpos anti-AXL humanizados son como sigue:

Las secuencias de DNA optimizadas que codifican los anticuerpos anti-AXL humanizados se sintetizaron mediante un método de PCR basado en oligonucleótidos solapados.

15 Los genes VL se clonaron en el vector pCEP4 utilizando el plásmido de la construcción de anticuerpo quimérico pCEP4_ch11B7k1. Los sitios de clonación son NheI (5') y BsiWI (3') que ya estaban incluidos en los genes sintetizados de los anticuerpos humanizados. Los genes VH se clonaron en el correspondiente vector de cadena pesada quimérico pCEP-PU_ch11B7g1 utilizando KpnI (5') y BlnI (3') como sitios de restricción. La optimización de DNA, la síntesis de genes, la clonación y la verificación de las secuencias se efectuaron en Eurofins Medigenomix GmbH, Martinsried, Alemania.

20

Ejemplo 20. Los anticuerpos de rata y quiméricos anti-Axl de la invención inhiben la fosforilación de Axl inducida por ligando in vitro en un grado similar

25 Se generaron derivados quiméricos de los anticuerpos de rata anti-AXL 11 B7 y 11 D5 como parte de esta invención (véase posteriormente). A fin de investigar si los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención y los correspondientes anticuerpos quiméricos anti-Axl de la invención eran capaces de inhibir la activación de Axl mediada por ligando Gas6 in vitro en un grado similar, se realizaron experimentos de ELISA sobre células de cáncer de cuello uterino CaSki. De ese modo, la activación de Axl mediada por Gas6 se detectó por un incremento en la fosforilación de tirosina receptora. En resumen, el día 1, 3×10^4 células por pocillo se sembraron en medio de crecimiento normal en placas de 96 pocillos de fondo plano. Al día siguiente, el medio de crecimiento se reemplazó por medio libre de suero para privar a las células de nutrientes durante la noche a lo largo de 24 h. También durante la noche, placas de 96 pocillos Maxi-Sorp negras (Nunc) se revistieron con anticuerpo de ratón antifosfotirosina 4G10 en 2 µg/ml de PBS y 4°C. El día 3, la solución de anticuerpo 4G10 se retiró y los pocillos Maxi-Sorp se bloquearon con PBS, BSA al 0,5%, durante al menos 4 h a temperatura ambiente. En paralelo, se preincubaron células con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml de anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 o anticuerpo quimérico anti-AXL ch11 B7 durante 1 h a 37°C y posteriormente se trataron con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) durante 10 min. a 37°C. A continuación, el medio se retiró rápidamente y las células se sometieron a lisis en tampón de lisis (HPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM DTA, glicerina al 10% y Triton X-100 al 1%) complementado con inhibidores de fosfatasa y proteasa (Na₄P₂O₇ 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, ortovanadato 1 mM, NaF 1 mM y aprotinina al 0,5%) durante 30 min. sobre hielo. Mientras tanto, el tampón de bloqueo se retiró y las placas Maxi-Sorp se lavaron 6 veces con tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,05%), antes de que los lisados se transfirieran y se incubaran durante la noche a 4°C. Después de que las placas se lavaran 6 veces con tampón de lavado el día 4, los pocillos se incubaron con anticuerpo de rata anti-AXL 12B7 biotinilado en 0,5 µg/ml de PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con tampón de lavado, y estreptavidina conjugada a AP (Chemicon n° SA110) diluida 1:4.000 en PBS se añadió a cada pocillo y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. Acto seguido, los pocillos se lavaron 6 veces con tampón de lavado y se añadió solución de sustrato AttoPhos (Roche n° 11681982). Usando un lector de placas Victor (Perkin Elmer), la fluorescencia de cada pocillo se recogió a una longitud de onda de excitación de 430 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm.

30

35

40

45

50 La Figura 17 muestra resultados representativos de este experimento para la línea celular de cáncer de cuello uterino CaSki. Como se demuestra por la disminución dependiente de la concentración de la fosforilación de Axl relativa, el anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 (A) y el anticuerpo quimérico anti-AXL ch11B7 (B) de la invención fueron capaces de bloquear la activación inducida por ligando de la tirosina cinasa receptora Axl en un grado similar. Se observaron efectos comparables aplicando los mismos ajustes experimentales con la línea celular de melanoma C-8161.

55 Ejemplo 21. Los anticuerpos de rata y quiméricos anti-Axl de la invención inhiben la fosforilación de p42/p44 MAP-cinasa inducida por ligando in vitro en un grado similar

Para verificar adicionalmente si los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención y los correspondientes anticuerpos quiméricos anti-Axl de la invención también eran capaces de inhibir la activación inducida por Gas6 de p42/p44

MAP-cinasa en células de cáncer de cuello uterino CaSki en un grado similar, se efectuaron experimentos de ELISA. Aquí, se detectó al activación de p42/p44 MAP-cinasa inducida por Gas6 por un incremento en la fosforilación de proteína (Thr202/Tyr204). En resumen, el primer día, 2×10^4 células por pocillo se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano. Al día siguiente, el medio de crecimiento normal se reemplazó por medio libre de suero para privar a las células de nutrientes durante 24 h. Posteriormente, las células se preincubaron con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 μ g/ml y 10 μ g/ml de anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 o anticuerpo quimérico anti-AXL ch11 B7 durante 1 h a 37°C y a continuación se trataron con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) durante 10 min. a 37°C. El medio se retiró rápidamente y las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS (pH 7,5) durante 30 min. a temperatura ambiente. La solución de formaldehído se retiró y las células se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,1%). Las células se desactivaron con H₂O₂ al 1%, NaN₃ al 0,1% en tampón de lavado y se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente. Acto seguido, la solución de desactivación se retiró, y las células se lavaron dos veces con tampón de lavado y se bloquearon con PBS, BSA al 0,5% durante 4 h a temperatura ambiente. Anticuerpo primario antifosfo-p42/p44 MAP cinasa (Thr202/Tyr204) (policlonal de conejo; Cell Signaling n° 9101) diluido 1:1.000 en PBS, BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,05%, EDTA 5 mM se añadió durante la noche a 4°C. El día 4, la solución de anticuerpo se retiró y la placa se lavó 3 veces con tampón de lavado. A continuación, anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP (Dianova n° 111-036-045) diluido 1:2.500 en PBS, BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,05%, EDTA 5 mM, se añadió a cada pocillo y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con tampón de lavado durante 5 min. cada una. Se añadió tetrametilbencinida (TMB, Calbiochem) y se comprobó a 620 nm. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ l de HCl 250 nM y la absorbancia se leyó a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm usando un lector de placas Vmax (Thermo Lab Systems).

La Figura 18 muestra resultados representativos de este experimento. El anticuerpo de rata anti-AXL 11 B7 (A) y el anticuerpo quimérico anti-AXL ch11 B7 (B) de la invención fueron capaces de bloquear la activación inducida por Gas6 de p42/p44 MAP-cinasa en células de cáncer de cuello uterino CaSki en un grado similar, como se indica por la disminución dependiente de la concentración de la fosforilación relativa de p42/p44 MAP-cinasa.

Ejemplo 22. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención tienen sinergia con agentes quimioterapéuticos para vencer la resistencia a fármacos in vitro

Como los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención resultaron interferir con la antiapoptosis mediada por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-Axl cl.7 privados de suero, surge la cuestión de si los anticuerpos anti-AXL antagonistas tendrían sinergia con agentes quimioterapéuticos para inducir la apoptosis, contribuyendo de ese modo a vencer la resistencia a fármacos. En este ejemplo, células NCI/ADR-RES (originalmente llamadas MCF-7/AdrR) – una línea celular de cáncer ovárico (Liscovitch y Ravid, 2007, Cancer Letters, 245, 350-352) que presentan un alto nivel de resistencia a varios agentes incluyendo doxorubicina (Fairchild y cols., 1987, Cancer Research, 47, 5141-5148; Xu y cols., 2002, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302, 963-971) – se incubaron con el anticuerpo anti-Axl antagonista 11 B7 y/o doxorubicina, y las tasas de apoptosis se determinaron mediante tinción con TUNEL. En resumen, se sembraron 3×10^4 células NCI/ADR-RES en medio de crecimiento normal por pocillo de un portaobjetos de cultivo de 8 cámaras (BD Falcon, n° cat. 354118) que se preincubaron con el mismo medio durante 1 h a 37°C. La mañana siguiente, el medio de crecimiento normal se retiró y las células se lavaron con y se cultivaron en medio reducido en suero (FCS al 0,5%). Por la tarde, anticuerpo de control isotópico 1 D5 o el anticuerpo anti-Axl antagonista 11 B7 se añadieron a concentraciones finales de 10 μ g/ml cada uno. Por la mañana del día 3, se añadió doxorubicina en concentraciones finales de 100 μ M, 150 μ M o 200 μ M, y las células se incubaron a 37°C. Después de 24 h, las células se enjuagaron una vez con PBS, se fijaron con formaldehído al 4% en PBS (pH 7,5) durante 20 min. a temperatura ambiente, se secaron al aire durante 5 min. y se almacenaron a -20°C. Usando el estuche Fluorescein-FragEL™ disponible comercialmente (Oncogene, n° cat. QIA39, que actualmente es distribuido a través de Merck-Calbiochem), se realizó tinción con TUNEL según las instrucciones del manual del proveedor (capítulo 'Fluorescein-FragEL™ of cell preparations fixed on slides', página 10). Aplicando microscopía de fluorescencia, las células se analizaron y se tomaron fotografías.

La Figura 19 muestra resultados representativos de este experimento. No se observó tinción con TUNEL, y de ahí tampoco apoptosis, con células de cáncer de ovario NCI/ADR-RES que se trataron con 100 μ M de doxorubicina, independientemente de si las células se han coincubado con anticuerpo de control o el anticuerpo anti-Axl antagonista 11 B7 (arriba). Sin embargo, con una concentración de 150 μ M de doxorubicina, solo se podría detectar una apoptosis muy débil en células cotratadas con anticuerpo de control, mientras que la coincubación con anticuerpo anti-Axl antagonista 11B7 dio como resultado una inducción sustancial de la apoptosis (mitad). Además, en presencia de 200 μ M de doxorubicina, la coincubación de células con 11 B7 incrementó significativamente las tasas de apoptosis en comparación con células que se incubaban con anticuerpo para IgG de control (abajo), indicando que el cotratamiento de células incluso resistentes a múltiples fármacos con ambos agentes quimioterapéuticos y anticuerpos anti-AXL antagonistas de la invención puede ser adecuado para vencer la resistencia a fármacos.

Ejemplo 23. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención tienen sinergia con agentes quimioterapéuticos para reducir el crecimiento de colonias independiente del anclaje in vitro

Se efectuaron ensayos en agar blando a fin de investigar la capacidad de anticuerpos anti-Axl de la invención para

inhibir el crecimiento celular independiente del anclaje bien solos o bien en combinación con agentes quimioterapéuticos. El ensayo de formación de colonias en agar blando es un ensayo in vitro estándar para probar células transformadas, ya que solo las células transformadas son capaces de crecer en agar blando.

5 En resumen, células de melanoma 750 C-8161 bien permanecieron sin tratar o bien se preincubaron con el anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11B7 en 15 µg/ml en medio IMDM (Gibco) durante 30 min. a 37°C. Posteriormente, las células se combinaron con solución de agar noble de Difco dando como resultado 50 µl de suspensión celular en agar superior en concentraciones de agar, FCS y 11 B7 de 0,35%, 0,2% y 7,5 µg/ml, respectivamente. Esta suspensión celular se dispuso sobre 50 µl de una capa inferior de agarosa al 0,7% que contenía FCS al 20% y finalmente se cubrió con otros 50 µl de una solución de capa de alimentación que contiene FCS al 0,2% así como cisplatino en concentraciones conformes. En el total de 150 µl por muestra, las concentraciones finales de 11 B7 y cisplatino fueron 2,5 µg/ml y 1,5 µM, 1,0 µM, 0,75 µM, 0,5 µM o 0,25 µM, respectivamente. Se dejó que se formaran colonias durante 5 días y a continuación se tiñeron con 50 µl de MTT (Sigma, 1 mg/ml en PBS) durante 3 horas a 37°C. Usando un sistema de cámara Scanalyzer HTS junto con el programa de formación de colonias HTS Bonit (Lemnatec, Wuerselen), se analizó por triplicado el efecto del anticuerpo de rata anti-AXL antagonista 11 B7 en ausencia o presencia de cisplatino.

La Figura 20 muestra resultados representativos de este experimento. Los datos presentados se refieren a la superficie global de colonias y reflejan tanto los números absolutos que se miden (A) como la inhibición del crecimiento relativa (B) ejercida por el cisplatino y/o los anticuerpos de rata anti-AXL antagonistas 11 B7. En comparación con las células de control no tratadas, la incubación con cisplatino condujo a un retardo en el crecimiento de colonias de un modo dependiente de la dosis. En línea con el efecto inhibitorio de 11 B7 solo en el intervalo de 30%, la combinación con el anticuerpo anti-Axl antagonista 11 B7 dio como resultado un efecto inhibitorio significativamente potenciado del cisplatino sobre el crecimiento en agar blando de células de melanoma C-8161, particularmente a concentraciones inferiores de cisplatino.

Ejemplo 24. Los anticuerpos de rata anti-AXL de la invención tienen sinergia con los agentes antineoplásicos para reducir fenómenos relacionados con tumores

En los ejemplos previos, se han observado efectos sinérgicos de los anticuerpos anti-AXL antagonistas de la invención coadministrados con doxorubicina con respecto a inducir la apoptosis y vencer la resistencia a fármacos en células de cáncer resistentes a múltiples fármacos tales como la línea celular de cáncer ovárico NCI/ADR-RES. Por otra parte, se detectaron efectos combinatorios de anticuerpos anti-AXL antagonistas de la invención y cisplatino en la reducción del crecimiento de colonias independiente del anclaje con la línea celular de melanoma C-8161. Por lo tanto, se han de esperar efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis y/o en el vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis tumoral cuando células cancerosas o pacientes que sufren enfermedades cancerosas se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o uno o más de otros agentes antineoplásicos. En particular, se han de esperar efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis y/o en el vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis tumoral cuando células de melanoma o pacientes que sufren melanoma se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o cualquier otro agente antineoplásico, que es preferiblemente, pero no se limita a, cisplatino, dacarbazina, temozolomida/temodal, muforano/fotemustina, paclitaxel o docetaxel. Por otra parte, se han de esperar efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis y/o en el vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis tumoral cuando células de cáncer ovárico o pacientes que sufren cáncer ovárico se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o cualquier otro agente antineoplásico, que es preferiblemente, pero no se limita a, doxorubicina, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, melfalano, altretamina, topotecano, ifosfamida, etopósido o 5-fluorouracilo. Adicionalmente, se han de esperar efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis y/o en el vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis tumoral cuando células de cáncer de próstata o pacientes que sufren cáncer de próstata se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o cualquier otro agente antineoplásico, que es preferiblemente, pero no se limita a, mitozantrona, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel o vinblastina. Por otra parte, se han de esperar efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis y/o en el vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis tumoral cuando células de cáncer gástrico/de estómago o pacientes que sufren cáncer gástrico/de estómago se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o cualquier otro agente antineoplásico, que es preferiblemente, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, mitomicina C, cisplatino, doxorubicina, metotrexato, etopósido, leucovorina, epirubicina, paclitaxel,

docetaxel o irinotecano. Además, se han de esperar efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis y/o en el vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis tumoral cuando células de

5 cáncer de mama o pacientes que sufren cáncer de mama se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o cualquier otro agente antineoplástico, que es preferiblemente, pero no se limita a, doxorubicina, epirubicina, paclitaxel, docetaxel, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, gemcitabina, capecitabina, vinorelbina o trastuzumab. Es más, se han de esperar efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis y/o en el

10 vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis tumoral cuando células de

15 cáncer de cuello uterino o pacientes que sufren cáncer de cuello uterino se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o cualquier otro agente antineoplástico, que es preferiblemente, pero no se limita a, cisplatino, ifosfamida, irinotecano, 5-fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina o topotecano. Por

20 otra parte, se han de esperar efectos sinérgicos en la inducción de la apoptosis y/o en el vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis tumoral cuando células de

25 cáncer pancreático o pacientes que sufren cáncer pancreático se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o cualquier otro agente antineoplástico, que es preferiblemente, pero no se limita a, gemcitabina, capecitabina o 5-fluorouracilo. Finalmente, pero no excluyendo otros tipos de cáncer, se han de esperar efectos sinérgicos en la

30 inducción de la apoptosis y/o en el vencimiento de la resistencia a fármacos de células tumorales, la supresión de la supervivencia de células tumorales, la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, la reducción de la migración de células tumorales, la extensión y la metástasis o el impedimento de la angiogénesis

35 tumoral cuando células de cáncer de pulmón o pacientes que sufren cáncer de pulmón se tratan con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con irradiación y/o cualquier otro agente antineoplástico, que es preferiblemente, pero no se limita a, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, etopósido, vinorelbina, vincristina, ifosfamida, gemcitabina, metotrexato, ciclofosfamida, lomustina o topotecano.

También se hace referencia a los siguientes puntos:

- 30 1. Un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de AXL e inhibe al menos parcialmente la actividad de AXL.
2. El anticuerpo monoclonal del punto 1, que reduce y/o bloquea la transducción de señales mediada por AXL.
- 35 3. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-2, que reduce y/o bloquea la fosforilación de AXL.
4. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-3, que reduce y/o bloquea la proliferación celular.
5. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-4, que reduce y/o bloquea la angiogénesis.
- 40 6. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-5, que reduce y/o bloquea la migración celular.
7. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-6, que reduce y/o bloquea la metástasis tumoral.
8. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-7, que reduce y/o bloquea la antiapoptosis medida por AXL.
- 45 9. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-8, que reduce y/o bloquea la señalización de PI3K mediada por AXL.
10. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-9, que es un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de los mismos.
- 50 11. El anticuerpo monoclonal del punto 10, que es un anticuerpo quimérico y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 38, 39, 41, 42, o al menos el dominio variable de la misma, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N° 37, 40, o al menos el dominio variable de la misma, o un aminoácido
- 55 que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% de la misma o un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo sobre el dominio extracelular de AXL.

- 5 12. El anticuerpo monoclonal del punto 10, que es un anticuerpo humanizado y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 44, 45 o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la misma y/o a secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N° 43, 46, o al menos el dominio variable de la misma, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la misma o un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo sobre el dominio extracelular de AXL.
- 10 13. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-12, que es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab'), un fragmento Fv, a diacuerpo o una molécula de anticuerpo monocatenaria.
14. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-13, que es del tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 15 15. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-14, que está acoplado a un grupo de marcaje.
16. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-15, que está acoplado a un grupo efector.
17. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-16, que es una proteína de andamiaje.
18. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-17, que comprende al menos:
- una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en
- 20 (a) una CDRH1 como la mostrada en las SEQ ID N°: 16, 22, 28 o una secuencia de CDRH1 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,
- (b) una CDRH2 como la mostrada en las SEQ ID N°: 17, 23, 29 o una secuencia de CDRH2 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma, y
- 25 (c) una CDRH3 como la mostrada en las SEQ ID N°: 18, 24, 30 o una secuencia de CDRH3 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma, y/o al menos:
- una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en
- (d) una CDRL1 como la mostrada en las SEQ ID N°: 13, 19, 25 o una secuencia de CDRL1 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,
- 30 (e) una CDRL2 como la mostrada en las SEQ ID N°: 14, 20, 26 o una secuencia de CDRL2 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma, y
- (f) una CDRL3 como la mostrada en las SEQ ID N°: 15, 21, 27 o una secuencia de CDRL3 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,
- 35 o un anticuerpo monoclonal que reconoce el mismo epítipo sobre el dominio extracelular de AXL.
19. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-17, que comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en
- (a) una CDRH1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 16 o una secuencia de CDRH1 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,
- 40 (b) una CDRLH2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 17 o una secuencia de CDRH2 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma, y
- (c) una CDRLH3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 18 o una secuencia de CDRH3 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,
- y/o un cadena ligera que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en
- 45 (d) una CDRL1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 13 o una secuencia de CDRL1 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,
- (e) una CDRL2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 14 o una secuencia de CDRL2 que difiere en uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 15 o una secuencia de CDRL3 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma, o

un anticuerpo monoclonal que reconoce el mismo epítipo sobre el dominio extracelular de AXL.

5 20. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-17, que comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en

(a) una CDRLH1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 22 o una secuencia de CDRH1 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,

(b) una CDRLH2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 23 o una secuencia de CDRH2 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma, y

10 (c) una CDRLH3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 24 o una secuencia de CDRH3 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,

y/o una cadena ligera que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en

(d) una CDRL1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 19 o una secuencia de CDRL1 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,

15 (e) una CDRL2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 20 o una secuencia de CDRL2 que difiere en uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 21 o una secuencia de CDRL3 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,

o un anticuerpo monoclonal que reconoce el mismo epítipo sobre el dominio extracelular de AXL.

20 21. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-17, que comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en

(a) una CDRLH1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 28 o una secuencia de CDRH1 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,

25 (b) una CDRLH2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 29 o una secuencia de CDRH2 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma, y

(c) una CDRLH3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 30 o una secuencia de CDRH3 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,

y/o una cadena ligera que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en

30 (d) una CDRL1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 25 o una secuencia de CDRL1 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,

(e) una CDRL2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 26 o una secuencia de CDRL2 que difiere en uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 27 o una secuencia de CDRL3 que difiere en 1 o 2 aminoácidos de la misma,

35 o un anticuerpo monoclonal que reconoce el mismo epítipo sobre el dominio extracelular de AXL.

40 22. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-17, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8, 10, 12, o al menos el dominio variable de la misma, o un aminoácido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N° 7, 9, 11, o al menos el dominio variable de la misma, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la misma o un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo sobre el dominio extracelular de AXL.

23. Una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en:

45 (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo o un derivado del mismo de cualquiera de los puntos 1-22,

(b) una secuencia de ácido nucleico como la mostrada en las SEQ ID N°: 1-6, 31-36,

(c) un ácido nucleico complementario a cualquiera de las secuencias de (a) o (b); y

(d) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse a (a), (b) o (c) bajo condiciones restrictivas.

24. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico del punto 23.

5 25. El vector según el punto 24, que es un vector de expresión y la secuencia de ácido nucleico está conectada operativamente a una secuencia de control.

26. Un huésped que comprende el vector del punto 24 o 25.

27. El huésped del punto 26, que es una célula humana, bacteriana, animal, fúngica, de anfibio o vegetal.

28. El huésped del punto 26, que es un animal transgénico no humano.

10 29. Un procedimiento para fabricar un anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-22, que comprende la etapa de obtener dicho polipéptido del huésped del punto 26, 27 o 28.

30. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-AXL, preferiblemente el anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los puntos 1-22, la molécula de ácido nucleico del punto 23, el vector del punto 24 o 25, el huésped del punto 26, 27 o 28, o un polipéptido generado por el procedimiento del punto 29.

15 31. La composición farmacéutica del punto 30, que comprende portadores, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

32. La composición farmacéutica según el punto 30 o 31, que comprende un agente activo adicional.

33. La composición farmacéutica según uno cualquiera de los puntos 30-32, para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

20 34. La composición farmacéutica según uno cualquiera de los puntos 30-33, en la que dicha enfermedad hiperproliferativa está asociada con la expresión, la sobreexpresión y/o la hiperactividad de AXL.

35. La composición farmacéutica del punto 33, en la que dicha enfermedad hiperproliferativa se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón y otros cánceres que expresan o sobreexpresan AXL, y formación de metástasis tumorales.

25 36. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-22, para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

37. Uso del anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-22, para la fabricación de una composición farmacéutica para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

30 38. El uso según el punto 36 o 37, en el que dicha enfermedad hiperproliferativa es una enfermedad hiperproliferativa como la definida en uno cualquiera de los puntos 34 o 35.

39. Un método para diagnosticar una afección asociada con la expresión de AXL, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-22, y detectar la presencia de AXL.

35 40. El método según el punto 39, en el que la afección es una enfermedad hiperproliferativa como la definida en uno cualquiera de los puntos 34 o 35.

41. Un método para prevenir o tratar una afección asociada con la expresión de AXL en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de al menos el anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-22.

40 42. El método según el punto 41, en el que la afección es una enfermedad hiperproliferativa como la definida en uno cualquiera de los puntos 34 o 35.

43. El método según el punto 41 o 42, en el que el paciente es un paciente mamífero, particularmente un paciente humano.

45 44. Un estuche que comprende un anticuerpo anti-AXL, preferiblemente un anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-22, una secuencia de ácido nucleico según el punto 23 o un vector según el punto 24 o 25.

45. El estuche según la reivindicación 44, que comprende además un agente antineoplásico adicional.

46. Uso de un anticuerpo anti-AXL para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer resistente a fármacos.

47. Uso según el punto 46, en el que el anticuerpo anti-AXL es un anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-22.

5 48. Uso de un anticuerpo anti-AXL para la fabricación de un medicamento para la coadministración con un agente antineoplásico para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

49. Uso según el punto 48, en el que el anticuerpo anti-AXL es un anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los puntos 1-22.

Secuencia de nucleótidos del anticuerpo para AXL:

10 Sec. nº 1: Clon 11B7-VLk de rata 33:

| | | |
|-----|----------------------------------------------------|-----|
| 1 | GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG | 50 |
| 51 | ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT | 100 |
| 101 | AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTTCT | 150 |
| 151 | GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTA | 200 |
| 201 | GGTCTGGGTCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA | 250 |
| 251 | TATGGCAGACTATTACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTT | 300 |
| 301 | GGTGGA GGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGG | 350 |

Sec. nº 2: Clon 11B7-VH de rata 20:

| | | |
|-----|----------------------------------------------------|-----|
| 1 | GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT | 50 |
| 51 | CACTCTCCCTCACTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTAC | 100 |
| 101 | TGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGAT | 150 |
| 151 | ACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTCG | 200 |
| 201 | AATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCCTGCAGTTG | 250 |
| 251 | AACTCTGTAACCTTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACAA | 300 |
| 301 | CCTTTT ATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCTCCTCA | 350 |

Sec. nº 3: Clon 11D5-VLk de rata 10:

| | | |
|--------|----------------------------------------------------|-----|
| 1 | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTACATCTCTGGGAG | 50 |
| 51 | ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGTCAAGACATTGGAAATTATTT | 100 |
| 101 | AAGCTGGTTCCAACAGAAAGTAGGGAAATCTCCTAGGCGTATGATTTAT | 150 |
| 151 | GGTGCAATCAAGTTGGCAGTTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAGTA | 200 |
| 201 | GGTCTGGATCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA | 250 |
| 251 | TATGGCGATCTATTACTGTCTACAGTATATACAGTTTCCGCTCACGTTT | 300 |
| 15 301 | GGTTCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG | 350 |

Sec. nº 4: Clon 11D5-VH de rata 66:

| | | |
|-----|----------------------------------------------------|-----|
| 1 | GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT | 50 |
| 51 | CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCCATCACTAGTAATTA | 100 |
| 101 | CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA | 150 |
| 151 | CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAGTC | 200 |
| 201 | GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCCCTGCAGTT | 250 |
| 251 | GAATCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAGGA | 300 |
| 301 | GCGTTT GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCTCGTCA | 350 |

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 5: Clon 10D12-VLk de rata 8:

| | | |
|-----|----------------------------------------------------|-----|
| 1 | GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG | 50 |
| 51 | ACAGAGTCACTATTGCTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT | 100 |
| 101 | AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTTCT | 150 |
| 151 | GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTA | 200 |
| 201 | GGTCTGGGTCAGATTATTCTCGGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA | 250 |
| 251 | TATGGCAGACTATACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTTC | 300 |
| 301 | GGTGGG GGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGG | 350 |

Sec. nº 6: Clon 10D12-VH de rata 5:

| | | |
|-----|----------------------------------------------------|-----|
| 1 | GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAGCCCTCACAGT | 50 |
| 51 | CACTCTCCCTCACCTGCTCTGTCCACCGTTACTCCATCACTAGTAATTA | 100 |
| 101 | CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGA | 150 |
| 151 | TACATAACCAACAGTGGTGGCACTGCCTACAACCCATCTCTCAAAGTC | 200 |
| 201 | GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCCTGCAATT | 250 |
| 251 | GAACTCTGTAATTCCTGAGGACTCAGCCACATACTTCTGTTCAAGAACC | 300 |
| 301 | CCCTGG GACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA 336 | 350 |

5 Secuencia de aminoácidos del anticuerpo para AXL:

11B7:

Sec. nº 7: Clon 11B7-VLk de rata 33:

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | DIQMTQAPSSLPASLGDRVTITCRASQDIGNYLRWFQOKPGKSPRLMIS | 50 |
| 51 | GATNLAAGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDMADYYCLQSKESPWTF | 100 |
| 101 | GGGTKLELKR | 150 |

Sec. nº 8: Clon 11B7-VH de rata 20:

10 11D5:

Sec. nº 9: Clon 11D5-VLk de rata 10:

| | | |
|-----|----------------------------------------------------|-----|
| 1 | DIQMTQSPSSMSTSLGDRVTITCRASQDIGNYLSWFQOKVKGKSPRRMIY | 50 |
| 51 | GAIKLAVGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDMAIYYCLQYIQFPLTF | 100 |
| 101 | GSGTKLELKR | 150 |

Sec. nº 10: Clon 11D5-VH de rata 66:

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPGNKMEWIG | 50 |
| 51 | HITNSGNTTYNPSLKSRLSISRDTSRNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAKG | 100 |
| 101 | AFDYWGQGVMTVSS | 150 |

15 10D12:

Sec. nº 11: Clon 10D12-VLk de rata 8:

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | DIQMTQAPSSLPASLGDRVTIACRASQDIGNYLRWFQOKPGKSPRLMIS | 50 |
| 51 | GATNLAAGVPSRFSGSRSGSDYSRTISSLESEDMADYYCLQSKESPWTF | 100 |
| 101 | GGGTKLELKR | 150 |

Sec. nº 712: Clon 10D12-VH de rata 5:

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPGNKMEWMG | 50 |
| 51 | YITNSGGTAYNPSLKSRLSITRDTSKNQFFLQLNSVIPEDSATYFCSRT | 100 |
| 101 | PWDWGQGVMTVSS | 150 |

20

ES 2 556 214 T3

Secuencias de CDR

| Seq ID Nº: | Anticuerpo | CDR | Secuencia |
|------------|------------------------|-----|------------------|
| nº 13 | Cadena ligera de 11B7 | 1 | RASQDIGNYLR |
| nº 14 | Cadena ligera de 11B7 | 2 | GATNLAA |
| nº 15 | Cadena ligera de 11B7 | 3 | LQSKEPWT |
| nº 16 | Cadena pesada de 11B7 | 1 | SNYWG |
| nº 17 | Cadena pesada de 11B7 | 2 | YITYSGSTSYNPSLKS |
| nº 18 | Cadena pesada de 11B7 | 3 | ----TTFYY |
| nº 19 | Cadena ligera de 11D5 | 1 | RASQDIGNYLS |
| nº 20 | Cadena ligera de 11D5 | 2 | GAIKLAV |
| nº 21 | Cadena ligera de 11D5 | 3 | LQYIQFPLT |
| nº 22 | Cadena pesada de 11D5 | 1 | SNYWG |
| nº 23 | Cadena pesada de 11D5 | 2 | HITNSGNTTYNPSLKS |
| nº 24 | Cadena pesada de 11D5 | 3 | ----GAFDY |
| nº 25 | Cadena ligera de 10D12 | 1 | RASQDIGNYLR |
| nº 26 | Cadena ligera de 10D12 | 2 | GATNLAA |
| nº 27 | Cadena ligera de 10D12 | 3 | LQSKEPWT |
| nº 28 | Cadena pesada de 10D12 | 1 | SNYWG |
| nº 29 | Cadena pesada de 10D12 | 2 | YITNSGGTAYNPSLKS |
| nº 30 | Cadena pesada de 10D12 | 3 | ----TPWD- |

Secuencias de nucleótidos de quimerización

Sec. nº 31: ch11B7k

```

1      GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG      50
51     ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT      100
101    AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTTCT      150
151    GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTA      200
201    GGTCTGGGTCAGATTATTTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA      250
251    TATG                                                              300
301    GCAGACTATTACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTCCGGTG      350
351    GAGGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT      400
401    CATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT      450
451    GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA      500
500    AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGA      550
551    GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG      600
601    AGCAA                                                                650
      GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
5     GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

```

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 32: ch11B7g1

| | | |
|------|----------------------------------------------------|------|
| 1 | GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT | 50 |
| 51 | CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTA | 100 |
| 101 | CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGA | 150 |
| 151 | TACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTC | 200 |
| 201 | GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT | 250 |
| 251 | GAACTCTGTAACCTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACA | 300 |
| 301 | ACCTTT | 350 |
| 351 | TATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA | 400 |
| 401 | AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG | 450 |
| 451 | GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG | 500 |
| 500 | GTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT | 550 |
| 551 | TCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT | 600 |
| 601 | GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG | 650 |
| 651 | AATCAC | 700 |
| 701 | AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTG | 750 |
| 751 | ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG | 800 |
| 800 | ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATC | 850 |
| 851 | TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG | 900 |
| 901 | ACCTTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA | 950 |
| 951 | TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTG | 1000 |
| 1001 | GTCAGT | 1050 |
| 1051 | CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG | 1100 |
| 1101 | GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC | 1150 |
| 1151 | CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA | 1200 |
| 1200 | TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA | 1250 |
| 1251 | AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA | 1300 |
| 1301 | GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC | |
| | TCCTTC | |
| | TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA | |
| | ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC | |
| | GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA | |

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 33: ch11B7g2

1 GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT 50
 51 CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTA 100
 101 CTGGGGCTGGATCCGGAAGTCCCAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGA 150
 151 TACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTC 200
 201 GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCTGCTGAGTT 250
 251 GAACTCTGTAACCTTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACA 300
 301 ACCTTT 350
 351 TATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA 400
 401 AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGA 450
 451 GAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG 500
 500 GTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCT 550
 551 TCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT 600
 601 GACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA 650
 651 GATCAC 700
 701 AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTG 750
 751 TCGAGTGCACCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT 800
 800 CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCT 850
 851 GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCC 900
 901 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA 950
 951 GCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTC 1000
 1001 ACCGTT 1050
 1051 GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA 1100
 1101 ACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG 1150
 1151 GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAG 1200
 1200 ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC 1250
 1251 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA 1300
 1301 CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
 TACAGC
 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
 CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

Sec. nº 34: ch11D5k

1 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTACATCTCTGGGAG 50
 51 ACAGAGTCACCATTACTTGCCGGGCAAGTCAAGACATTGGAAATTATTT 100
 101 AAGCTGGTTCCAACAGAAAGTAGGGAAATCTCCTAGGCGTATGATTTAT 150
 151 GGTGCAATCAAGTTGGCAGTTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTA 200
 201 GGTCTGGATCAGATTATCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA 250
 251 TATG 300
 301 GCGATCTATTACTGTCTACAGTATATACAGTTTCCGCTCACGTTCCGTT 350
 351 CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT 400
 401 CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT 450
 451 GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGA 500
 500 AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA 550
 551 GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG 600
 5 601 AGCAAA 650
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
 GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 35: ch11D5g1

| | | |
|------|-----------------------------------------------------|------|
| 1 | GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT | 50 |
| 51 | CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCCATCACTAGTAATTA | 100 |
| 101 | CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA | 150 |
| 151 | CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAGTC | 200 |
| 201 | GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT | 250 |
| 251 | GAACTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAGGA | 300 |
| 301 | GCGTTT | 350 |
| 351 | GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA | 400 |
| 401 | AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG | 450 |
| 451 | GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG | 500 |
| 500 | GTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT | 550 |
| 551 | TCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT | 600 |
| 601 | GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG | 650 |
| 651 | AATCAC | 700 |
| 701 | AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG | 750 |
| 751 | ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG | 800 |
| 800 | ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATC | 850 |
| 851 | TCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG | 900 |
| 901 | ACCTTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA | 950 |
| 951 | TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTG | 1000 |
| 1001 | GTCAGC | 1050 |
| 1051 | GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT | 1100 |
| 1101 | GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC | 1150 |
| 1151 | CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA | 1200 |
| 1200 | TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA | 1250 |
| 1251 | AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA | 1300 |
| 1301 | GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC | |
| | TCCTTC | |
| | TTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA | |
| | ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC | |
| | GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA | |

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 36: ch11D5g2

| | | |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 | GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT | 50 |
| 51 | CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCCATCACTAGTAATTA | 100 |
| 101 | CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA | 150 |
| 151 | CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAGTC | 200 |
| 201 | GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT | 250 |
| 251 | GAACTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAGGA | 300 |
| 301 | GCGTTT | 350 |
| 351 | GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA | 400 |
| 401 | AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGA | 450 |
| 451 | GAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG | 500 |
| 500 | GTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCT | 550 |
| 551 | TCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT | 600 |
| 601 | GACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA | 650 |
| 651 | GATCAC | 700 |
| 701 | AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTG | 750 |
| 751 | TCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT | 800 |
| 800 | CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT | 850 |
| 851 | GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCC | 900 |
| 901 | AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA | 950 |
| 951 | GCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTC | 1000 |
| 1001 | ACCGTT | 1050 |
| 1051 | GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA | 1100 |
| 1101 | ACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG | 1150 |
| 1151 | GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG | 1200 |
| 1200 | ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC | 1250 |
| 1251 | CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA | 1300 |
| 1301 | CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA | |

5 Secuencias de aminoácidos de quimerización

Sec. nº 37: 11B7 LC κ

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | D I Q M T Q A P S S L P A S L G D R V T I T C R A | 25 |
| 25 | S Q D I G N Y L R W F Q Q K P G K S P R L M I S G | 50 |
| 51 | A T N L A A G V P S R F S G S R S G S D Y S L T I | 75 |
| 76 | S S L E S E D M A D Y Y C L Q S K E S P W T F G G | 100 |
| 101 | G T K L E L K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L | 125 |
| 126 | K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V | 150 |
| 151 | D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L | 200 |
| 176 | S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G | 225 |
| 201 | L S S P V T K S F N R G E C | 250 |

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 38: 11B7-HCγ1

1 E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T 25
 25 G Y S I T S N Y W G W I R K F P G D K M E W M G Y 50
 51 I T Y S G S T S Y N P S L K S R I S I T R D T S K 75
 76 N Q F F L Q L N S V T S E D T A T Y Y C A I T T F 100
 101 Y Y W G Q G V M V T V S S A S T K G P S V F P L A 125
 126 P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V 150
 151 T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L 200
 176 Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H 225
 201 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C 250
 226 P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S 275
 251 R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V 300
 301 D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S 325
 326 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P 350
 350 A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S 375
 376 R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V 400
 401 E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F 425
 426 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H 450
 451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

Sec. nº 39: 11B7 HC γ2

1 E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T 25
 25 G Y S I T S N Y W G W I R K F P G D K M E W M G Y 50
 51 I T Y S G S T S Y N P S L K S R I S I T R D T S K 75
 76 N Q F F L Q L N S V T S E D T A T Y Y C A I T T F 100
 101 Y Y W G Q G V M V T V S S A S T K G P S V F P L A 125
 126 P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V 150
 151 T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L 200
 176 Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H 225
 201 K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P 250
 226 P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E 275
 251 V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E 300
 301 V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V 325
 326 V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E 350
 350 K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M 375
 376 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S 400
 401 N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S 425
 426 K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H 450
 451 N H Y T Q K S L S L S P G K

5

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 40: 11D5 LC κ

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | D I Q M T Q S P S S M S T S L G D R V T I T C R A | 25 |
| 25 | S Q D I G N Y L S W F Q Q K V G K S P R R M I Y G | 50 |
| 51 | A I K L A V G V P S R F S G S R S G S D Y S L T I | 75 |
| 76 | S S L E S E D M A I Y Y C L Q Y I Q F P L T F G S | 100 |
| 101 | G T K L E L K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L | 125 |
| 126 | K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V | 150 |
| 151 | D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L | 200 |
| 176 | S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G | 225 |
| 201 | L S S P V T K S F N R G E C | 250 |

Sec. nº 41: 11D5 HC γ1

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T | 25 |
| 25 | G Y S I T S N Y W G W I R K F P G N K M E W I G H | 50 |
| 51 | I T N S G N T T Y N P S L K S R I S I S R D T S R | 75 |
| 76 | N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A K G A F | 100 |
| 101 | D Y W G Q G V M V T V S S A S T K G P S V F P L A | 125 |
| 126 | P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V | 150 |
| 151 | T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L | 175 |
| 176 | Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H | 200 |
| 201 | K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C | 225 |
| 226 | P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S | 250 |
| 251 | R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V | 275 |
| 276 | D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S | 300 |
| 301 | V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P | 325 |
| 326 | A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S | 350 |
| 350 | R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V | 375 |
| 376 | E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F | 400 |
| 401 | F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H | 425 |
| 426 | E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K | 450 |

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 42: 11D5 HC y2

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T | 25 |
| 25 | G Y S I T S N Y W G W I R K F P G N K M E W I G H | 50 |
| 51 | I T N S G N T T Y N P S L K S R I S I S R D T S R | 75 |
| 76 | N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A K G A F | 100 |
| 101 | D Y W G Q G V M V T V S S A S T K G P S V F P L A | 125 |
| 126 | P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V | 150 |
| 151 | T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L | 200 |
| 176 | Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H | 225 |
| 201 | K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P | 250 |
| 226 | P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E | 275 |
| 251 | V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E | 300 |
| 301 | V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V | 325 |
| 326 | V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E | 350 |
| 350 | K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M | 375 |
| 376 | T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S | 400 |
| 401 | N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S | 425 |
| 426 | K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H | 450 |
| 451 | N H Y T Q K S L S L S P G K | |

Secuencias de aminoácidos de humanización

Sec. nº 43: Hum11B7-VLk:

| | | |
|-------|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A R C D I Q | 25 |
| 25 | M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D | 50 |
| 51 | I G N L R W Y Q Q K P G K A P K L L I Y G A T N L | 75 |
| 76 | A A G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q | 100 |
| 101 | P E D F A T Y Y C L Q S K E S P W T F G Q G T K V | 125 |
| 5 126 | E I K | 150 |

Sec. nº 44: Hum11B7-VH:

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | M K H L W F F L L L V A A P R W V L S Q V Q L Q E | 25 |
| 25 | S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S | 50 |
| 51 | N Y W G W I R Q P P G K G L E W I G Y I T Y S G S | 75 |
| 76 | T S Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K | 100 |
| 101 | L S S V T A A D T A V Y Y C A R T T F Y Y W G Q G | 125 |
| 126 | T L V T V S S | 150 |

Sec. nº 46: Hum11D5-VLk:

| | | |
|--------|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | M D M R V L A Q L L G L L L L C F P G A R C D I Q | 25 |
| 25 | M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D | 50 |
| 51 | I G N Y L S W F Q Q K P G K A P K S L I Y G A I K | 75 |
| 76 | L A V G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L | 100 |
| 101 | Q P E D F A T Y Y C L Q Y I Q F P L T F G G G T K | 125 |
| 10 126 | V E I K | 150 |

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 45: Hum11D5-VH:

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | M K H L W F F L L L V A A P R W V L S Q V Q L Q E | 25 |
| 25 | S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S | 50 |
| 51 | N Y W G W I R Q P P G K G L E W I G H I T N S G N | 75 |
| 76 | T T Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K | 100 |
| 101 | L S S V T A A D T A V Y Y C A R G A F D Y W G Q G | 125 |
| 126 | T L V T V S S | 150 |

Secuencias de nucleótidos de humanización

Sec. nº 47: Hum11B7-VLk (427 pb)

| | | |
|-------|-----------------------------------------------------|-----|
| 1 | AATTA AAAAGCTAGCAAGCTTGCCACCATGGATATGCGTGTACCTGCACA | 50 |
| 51 | GCTGTTAGGACTGCTTCTGCTCTGGCTTAGGGGAGCAAGATGCGACATC | 100 |
| 101 | CAGATGACTCAGAGCCCAAGCTCCTTGTCTGCCAGTGTGGGTGATAGGG | 150 |
| 151 | TCACCATAACCTGTTCGAGCTTCACAGGATATCGGCAACTACCTACGCTG | 200 |
| 201 | GTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCCCCAAAGCTGCTGATCTATGGCGCC | 250 |
| 251 | ACCAATCTGGCTGCTGGTGTTCCTCTCGGTTTCAGTGGGTCTGGATCAG | 300 |
| 301 | GCACAGACTTCACACTCACCATTTCAGCCTCCAACCCGAGGACTTTGC | 350 |
| 351 | GACGTACTACTGCTTGCAGTCCAAGGAATCCCCTTGGACATTTGGGCAA | 400 |
| 5 401 | GGGACTAAGGTGGAGATTAAGCGTACGAATTA AAA | |

Sec. nº 48: Hum11B7-VH (429 pb)

| | | |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1 | AATTAAGGTACCAAGCTTGCCACCATGAAGCACCTCTGGTTCCTTCTCC | 50 |
| 51 | TGCTAGTGGCTGCTCCTCGCTGGGTGTTGAGCCAGGTTTCAGTTGCAGGA | 100 |
| 101 | ATCTGGACCAGGACTGGTCAAACCTCTGAGACACTGTCACTGACATGC | 150 |
| 151 | ACT | 200 |
| 201 | GTGTCAGGTGGCTCCATTTCCCTCCA ACTATTGGGGCTGGATTCGGCAAC | 250 |
| 251 | CTCCGGGAAAAGGGCTTGAGTGGATAGGCTACATCACCTATTCTGGGAG | 300 |
| 301 | TACCTCCTACAATCCCAGTCTTAAGAGCAGGGTACTATCAGCGTAGAC | 350 |
| 351 | ACC | 400 |
| 401 | TCCAAGAACCAGTTTAGCCTCAAGCTGAGTTCTGTGACTGCAGCGGATA CAGCCGTCTACTATTGTGCCAGAACCACGTTCTACTATTGGGGTCAGGG CACATTAGTCACCGTTAGCTCAGCGAATTAA | |

Sec. nº 49: Hum11D5-VLk (427 pb)

| | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1 | AATTA AAAAGCTAGCAAGCTTGCCACCATGGATATGCGCGTCTTAGCCCA | 50 |
| 51 | ACTACTCGGTCTGCTTCTGTTGTGCTTTCCAGGAGCCAGGTGTGACATC | 100 |
| 101 | CAGATGACACAGTCCCCTAGTAGCCTGTCTGCGTCTGTAGGCGATCGAG | 150 |
| 10 151 | TGA | 200 |
| 201 | CCATTACCTGCAGAGCTTCCCAGGATATTGGCAACTATCTGAGCTGGTT | 250 |
| 251 | TCAGCAGAAACCAGGCAAAGCACCCAAGAGTCTCATCTATGGGGCCATC | 300 |
| 301 | AAGCTCGCTGTTGGTGTGCCCTTCACGGTTTTCCGGATCTGGGTGAGGCA | 350 |
| 351 | CAG | 400 |
| 401 | ACTTCACTCTGACCATTTCAGCCTTCAACCGGAAGACTTCGCAACGTA CTACTGTCTGCAGTACATCCAGTTCCTTACTTTCGGTGGAGGGACA AAGGTGGAGATAAAGCGTACGAATTA AAA | |

ES 2 556 214 T3

Sec. nº 50: Hum11D5-VH (429 pb)

| | | |
|-----|---------------------------------------------------|-----|
| 1 | AATTAAGGTACCAAGCTTGCCACCATGAAGCATCTGTGGTTCTTTCTGC | 50 |
| 51 | TGCTTGTGGCTGCTCCTAGGTGGGTGTTAAGCCAGGTCAGCTCCAGGA | 100 |
| 101 | ATCTGGTCCCGGATTGGTGAAACCGAGTGAGACTCTATCCCTGACATGC | 150 |
| 151 | ACC | 200 |
| 201 | GTTAGTGGAGGCAGTATCTCTAGCAACTATTGGGGCTGGATTCGGCAAC | 250 |
| 251 | CACCTGGTAAGGGCCTTGAGTGGATTGGGCACATCACCAACTCTGGGAA | 300 |
| 301 | TACCACCTACAATCCCTCCCTGAAATCACGCGTCACGATAAGCGTGGAC | 350 |
| 351 | ACT | 400 |
| 401 | TCCAAGAACCAGTTCTCCCTCAAGCTCTCAAGCGTCACAGCAGCGGATA | |
| | CAGCCGTATACTACTGTGCAAGAGGGGCCTTTGACTATTGGGGACAGGG | |
| | CACATTGGTGACTGTCAGCTCAGCGAATTAA | |

Cebador

| Seq ID N° | Cebador: | Secuencia |
|-----------|----------------------|----------------------------------------------------------------|
| #51 | k-GSP1 | GATGGATGCATTGGTGCAGC |
| #52 | nueva_k_GSP1 | ATAGATACAGTTGGTGCAGC |
| #53 | pesada_GSP1 | CAGGGTCACCATGGAGTTA |
| #54 | XhoI-hGSP2 | CCGCTCGAGCGGGCCAGTGGATAGACAGATGG |
| #55 | XhoI-kGSP2 | CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG |
| #56 | RT-γ: | GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG |
| #57 | RT-γ2 | GGG CTT GCC GGC CGT G |
| #58 | RT-k | TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG |
| #59 | 5'Blp | AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC ATC GGT |
| #60 | 3' Bam(GAG): | AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G |
| #61 | 5' Bsi: | AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT CTT CAT |
| #62 | 3' Bam(CTT): | AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT |
| #63 | VL-11B7-5': | AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GGC TCC |
| #64 | VL-11B7-3': | AGA TCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TGC CTC |
| #65 | VL-11D5-5': | AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GTC TCC ATC |
| #66 | VL-11D5-3': | AGA TCG TAC GTT TCA GCT TGG TCC CAG |
| #67 | VH-11B7/ 11D5-5': | AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA GGT GCA GCT TCA GGA GTC AGG |
| #68 | VH-11B7/ 11D5-3': | AGA TGC TGA GCT GAC AGT GAC CAT GAC TCC TTG GCC |
| #69 | MOUSE1 | GCG AAT TCG CCA CCA TGG GCA GGG TCC CGC TGG CCT G |
| #70 | MOUSE2 | CAG CCG AGG TAT AGG CTG TCA CAG ACA CAG TCA G |
| #71 | MOUSE3 | GCA CCC TGT TAG GGT ACC GGC TGG CAT ATC |
| #72 | MOUSE4 | ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGG CTC CGT CCT CCT GCC CTG |
| #73 | CYNO1 | AAT TCG CCA CCA TGG CGT GGC GGT GCC CCA G |
| #74 | CYNO2 | CTC TGA CCT CGT GCA GAT GGC AAT CTT CAT C |
| #75 | CYNO3 | GTG GCC GCT GCC TGT GTC CTC ATC |
| #76 | CYNO4 | ATA AGA ATG C GG CCG CTC AGG CAC CAT CCT CCT GCC CTG |
| #77 | MER1 | CGG AAT TCG CCA CCA TGG GGC CGG CCC CGC TGC CGC |
| #78 | MER2 | TCG GCT GCC ATT CTG GCC AAC TTC C |
| #79 | SKY1 | CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGC TGA GGC GGA GC |
| #80 | SKY2 | GCC CTC GAG CTA ACA GCT ACT GTG TGG CAG TAG |

ES 2 556 214 T3

Secuencia líder

Secuencia de nucleótidos

Sec. nº 81: 1 ATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGG TGTGCATTCC 52

Secuencia de aminoácidos

5 Sec. nº 82: 1 M G D N D I H F A F L S T G V H S 17

AXL de ratón y cynomolgus

Sec. nº 83: Secuencia de nucleótidos de AXL de cynomolgus

ES 2 556 214 T3

| | | |
|------|----------------------------------------------------|------|
| 1 | ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGGATGGGCAGGGTCCCGCTGGCCTGGTGCT | 50 |
| 51 | TGGCGCTGTGCGGCTGGGTGTGCATGGCCCCAGGGGCACACAGGCTGA | 100 |
| 101 | AGAAAGTCCTTTTCGTGGGTAACCCAGGGAATATCACAGGTGCCCGGGGA | 150 |
| 151 | CTCACGGGCACCCCTTCGGTGTGAGCTCCAGGTTTCAGGGAGAGCCCCCG | 200 |
| 201 | AGGTACACTGGCTTCGGGACGGACAGATCCTGGAGCTCGCGGACAGTAC | 250 |
| 251 | CCAGACCCAGGTGCCCTGGGTGAAGATGAGCAGGATGACTGGATAGTG | 300 |
| 301 | GTCAGCCAGCTCAGAATCGCCTCCCTACAGCTTTCGGACGCGGGACAGT | 350 |
| 351 | ACCAGTGTTTGGTGTTTCTGGGACATCAGAACTTCGTGTCCCAGCCTGG | 400 |
| 401 | CTACGTAGGGCTGGAGGGCTTACCTTACTTCTGGAGGAGCCTGAGGAC | 450 |
| 451 | AGGACTGTGGCCGCCAACACCCCTTCAACCTGAGCTGCCAAGCCCAGG | 500 |
| 501 | GACCCCAGAGCCCGTGGACCTACTCTGGCTCCAGGATGCTGTCCCCCT | 550 |
| 551 | GGCCACAGCTCCAGGTCATGGTCCCAGCGCAACCTGCATGTTCCAGGG | 600 |
| 601 | CTGAACAAGACATCCTCTTCTCCTGCGAAGCCATAACGCCAAGGGAG | 650 |
| 651 | TCACCACATCCCGCACGGCCACCATCACAGTGCTCCCCAGCAGCCCCG | 700 |
| 701 | TAACCTCCATCTGGTCTCCCGCCAACCCACGGAGCTGGAGGTGGCTTGG | 750 |
| 751 | ACTCCAGGCCCTGAGCGGCATCTACCCCTGACCCACTGCACCCTGCAGG | 800 |
| 801 | CTGTGCTGTCAGACGATGGGATGGGCATCCAGGCGGGAGAACCAGACCC | 850 |
| 851 | CCCAGAGGAGCCCCTCACCTTGCAAGCATCTGTGCCCCCCCACCAGCTT | 900 |
| 901 | CGGCTGGGCAGCCTCCATCCTCACACCCCTTATCACATCCGTGTGGCAT | 950 |
| 951 | GCACCAGCAGCCAGGGCCCCCTCATCCTGGACACACTGGCTTCTGTGGA | 1000 |
| 1001 | GACGCCGGAGGGAGTGCCCTGGGCCCCCCTGAGAACATTAGTGCCACG | 1050 |
| 1051 | CGGAATGGGAGCCAGGCCCTTCGTGCATTGGCAGGAGCCCCGGGCGCCCC | 1100 |
| 1101 | TGCAGGGTACCCTGTTAGGGTACCGGCTGGCGTATCAAGGCCAGGACAC | 1150 |
| 1151 | CCCAGAGGTGCTAATGGACATAGGGCTAAGGCAAGAGGTGACCCTGGAG | 1200 |
| 1201 | CTGCAGGGGGACGGGTCTGTGTCCAATCTGACAGTGTGTGTGGCAGCCT | 1250 |
| 1251 | ACACTGCTGCTGGGGATGGACCCTGGAGCCTCCCAGTACCCCTGGAGGC | 1300 |
| 1301 | CTGGCGCCAGGGCAAGCACAGCCAGTCCACCAGCTGGTGAAGGAACT | 1350 |
| 1351 | TCAGCTCCTGCCTTCTCGTGGCCCTGGTGGTATATACTGCTAGGAGCAG | 1400 |
| 1401 | TCGTGGCCGCTGCCTGTGTCTCATCTTGGCTCTCTTCCTTGTCCACCG | 1450 |
| 1451 | GCGAAAGAAGGAGACCCGTTATGGAGAAGTGTTTCGAGCCAACAGTGAA | 1500 |
| 1501 | AGAGGTGAAGTGGTAGTCAGGTACCGCGTGCGCAAGTCCTACAGTCGCC | 1550 |
| 1551 | GGACCACTGAAGCTACCTTGAACAGCCTGGGCATCAGTGAAGAGCTGAA | 1600 |
| 1601 | GGAGAAGCTGCGGGATGTGATGGTGGACCGGCACAAGGTGGCCCTGGGG | 1650 |
| 1651 | AAGACTCTGGGAGAAGGAGAGTTTGGAGCCGTGATGGAAGGCCAGCTCA | 1700 |
| 1701 | ACCAGGACGACTCCATCCTCAAGGTGGCTGTGAAGACAATGAAGATTGC | 1750 |
| 1751 | CATCTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGATTTCCCTGAGTGAAGCAGTCTGC | 1800 |
| 1801 | ATGAAGGAATTCGACCATCCCAATGTCATGAGGCTCATCGGTGTCTGTT | 1850 |
| 1851 | TCCAGGGTTCTGAACGAGAGAGCTTTCAGCACCTGTGGTTCATCTTACC | 1900 |
| 1901 | TTTCATGAAGCATGGAGACCTACACAGCTTCCCTCCTCTATTCCCAGCTT | 1950 |
| 1951 | GGGGACCAGCCAGTGTACCTGCCACTCAGATGCTAGTGAAGTTCATGG | 2000 |
| 2001 | CGGACATCGCCAGTGGCATGGAATATCTGAGTACCAAGAGATTCATACA | 2050 |
| 2051 | CCGGGACCTGGCGGCCAGGAACTGCATGCTGAATGAGAACATGTCCGTG | 2100 |
| 2101 | TGTGTGGCGGACTTCGGGCTCTCCAAGAAGATCTACAACGGGGACTACT | 2150 |
| 2151 | ACCGCCAGGGACGTATCGCCAAGATGCCAGTCAAGTGGATTGCCATTGA | 2200 |
| 2201 | GAGTCTAGCTGACCGTGTCTACACGAGCAAGAGTGATGTGTGGTCTTTC | 2250 |
| 2251 | GGGGTGACAATGTGGGAGATTGCCACAAGAGGCCAAACCCCATATCCAG | 2300 |
| 2301 | GCGTGGAGAACAGCGAGATTTATGACTATCTGCGCCAGGGAAATCGCCT | 2350 |
| 2351 | GAAGCAGCCTGCGGACTGTCTGGATGGACTGTATGCCTTGATGTCCGG | 2400 |

ES 2 556 214 T3

2401 TGCTGGGAGCTAAATCCCCAGGACCGGCCAAGTTTTACAGAGCTGCGGG 2450
 2451 AAGATTTGGAGAACACACTGAAGGCCTTGCCTCCTGCCAGGAGCCTGA 2500
 2501 CGAAATCCTCTATGTCAACATGGATGAAGGTGGAGGTTATCCTGAACCT 2550
 2551 CCCGGCGCTGCTGGAGGAGCTGACCCCCCAACCCAGCTAGACCCTAAGG 2600
 2601 ATTCCTGTAGCTGCCTCACTTCGGCTGAGGTCCATCCTGCTGGACGCTA 2650
 2651 TGTCTCTGCCCTTCCACAGCCCCTAGCCCCGCTCAGCCTGCTGATAGG
 GGCTCCCCAGCAGCCCCAGGGCAGGAGGATGGTGCC

Sec. nº 84: Secuencia de aminoácidos de AXL de cynomolgus

1 MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGARG 50
 51 LTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDLRQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIV 100
 101 VSQRLIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLLEGLPYFLEEPED 150
 151 RTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPG 200
 201 LNKTSFSCEAHNAKGVTTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAW 250
 251 TPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQL 300
 301 RLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISAT 350
 351 RNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTL 400
 401 LQGDGSVSNLTVCVAAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKET 450
 451 SAPAFSWPWYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTE 500
 501 RGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGI SEELKEKLRDVMVDRHKVALG 550
 551 KTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVC 600
 601 MKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRL 650
 651 GDQPVYLPQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSV 700
 701 CVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYTSKSDVWSF 750
 751 GVTMWEIATRQTPYPGVENSEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSR 800
 801 CWELNPQDRPSFTELREDLENTLTKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEP 850
 851 PGAAGGADPPTQLDPKDCSCLTSAEVHPAGRYVLC PSTAPSPAQPADR 900
 GSPAAPGQEDGA

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de AXL e inhibe al menos parcialmente la actividad de AXL, en donde el anticuerpo monoclonal comprende al menos:

una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende las CDR

5 (a) CDRH1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 16,

(b) CDRH2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 17, y

(c) CDRH3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 18 y al menos:

una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende las CDR

(d) CDRL1 como la mostrada en la SEQ ID N°: 13,

10 (e) CDRL2 como la mostrada en la SEQ ID N°: 14 y

(f) CDRL3 como la mostrada en la SEQ ID N°: 15.

15 2. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que reduce y/o bloquea la transducción de señales mediada por AXL, reduce y/o bloquea la fosforilación de AXL, reduce y/o bloquea la proliferación celular, reduce y/o bloquea la angiogénesis, reduce y/o bloquea la migración celular, reduce y/o bloquea la metástasis tumoral, reduce y/o bloquea la antiapoptosis mediada por AXL y/o reduce y/o bloquea la señalización de PI3K mediada por AXL.

20 3. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2, que es un anticuerpo quimérico y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 38, 39, o al menos el dominio variable de la misma, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 37, o al menos el dominio variable de la misma, o que es un anticuerpo humanizado y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 44, o al menos el dominio variable de la misma, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 43, o al menos el dominio variable de la misma.

25 4. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 8, o al menos el dominio variable de la misma, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 7, o al menos el dominio variable de la misma.

5. Una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y

30 (b) un ácido nucleico complementario a cualquiera de las secuencias de (a)

6. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 5.

7. Un huésped no humano que comprende el vector según la reivindicación 6, que es una célula bacteriana, animal, fúngica, de anfibio o vegetal.

35 8. Un huésped no humano que comprende el vector según la reivindicación 6, que es un animal transgénico no humano.

9. Un procedimiento para fabricar un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende la etapa de obtener dicho anticuerpo del huésped no humano según las reivindicaciones 7 u 8.

40 10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-AXL según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, el vector según la reivindicación 6, el huésped no humano según la reivindicación 7 u 8 o un anticuerpo generado mediante el procedimiento según la reivindicación 9.

45 11. La composición farmacéutica según la reivindicación 10, para el uso en el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa, que está asociada con la expresión, la sobreexpresión y/o la hiperactividad de AXL o se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón y otros cánceres que expresan o sobreexpresan AXL, y la formación de metástasis tumorales.

12. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para el uso en el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

13. El anticuerpo monoclonal para el uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad hiperproliferativa es una enfermedad que está asociada con la expresión, la sobreexpresión y/o la hiperactividad de AXL o se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón y otros cánceres que expresan o sobreexpresan AXL, y la formación de metástasis tumorales
- 5 14. Un método in vitro para diagnosticar una afección asociada con la expresión de AXL, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y detectar la presencia de AXL, y en donde dicha muestra es de células o tejidos.
- 10 15. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para el uso en la prevención o el tratamiento de una afección asociada con la expresión de AXL en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de al menos el anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la afección es una enfermedad hiperproliferativa que está asociada con la expresión, la sobreexpresión y/o la hiperactividad de AXL o se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón y otros cánceres que expresan o sobreexpresan AXL, y la formación de metástasis tumorales.
- 15 16. El anticuerpo monoclonal para el uso según la reivindicación 15, en el que dicha afección es una enfermedad hiperproliferativa que está asociada con la expresión, la sobreexpresión y/o la hiperactividad de AXL o se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón y otros cánceres que expresan o sobreexpresan AXL, y la formación de metástasis tumorales.
- 20 17. Un estuche que comprende un anticuerpo anti-AXL según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 y un agente antineoplástico.
18. Uso de un anticuerpo anti-AXL para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer resistente a fármacos, en el que el anticuerpo anti-AXL es un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 25 19. Uso de un anticuerpo anti-AXL para la fabricación de un medicamento para la coadministración con un agente antineoplástico para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa, en donde el anticuerpo anti-AXL es un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

Figura 1

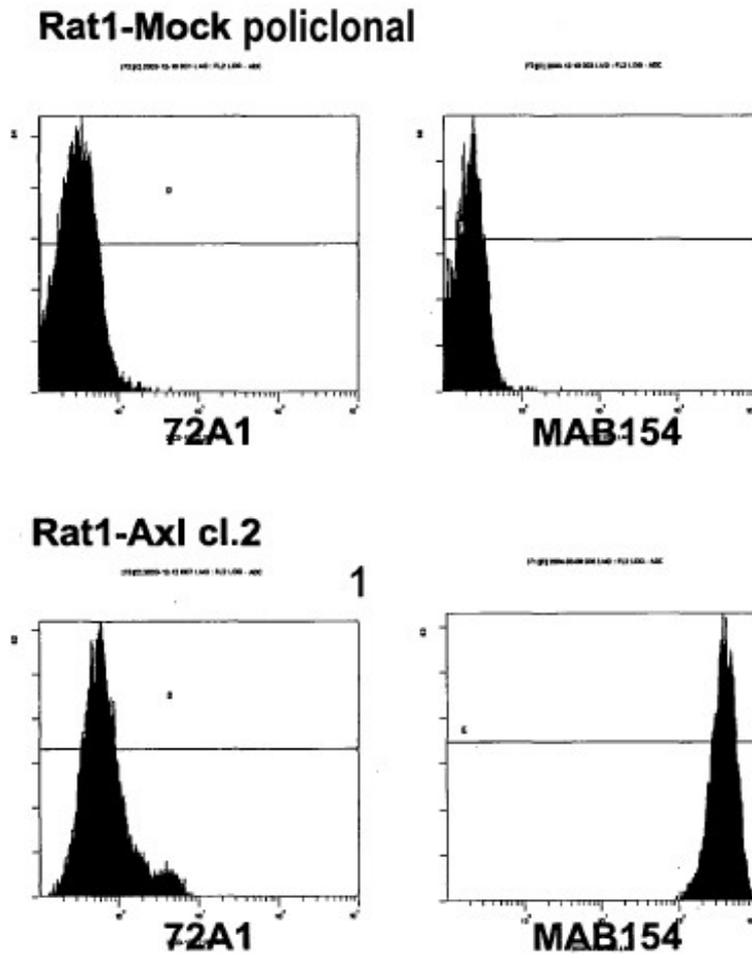


Figura 2

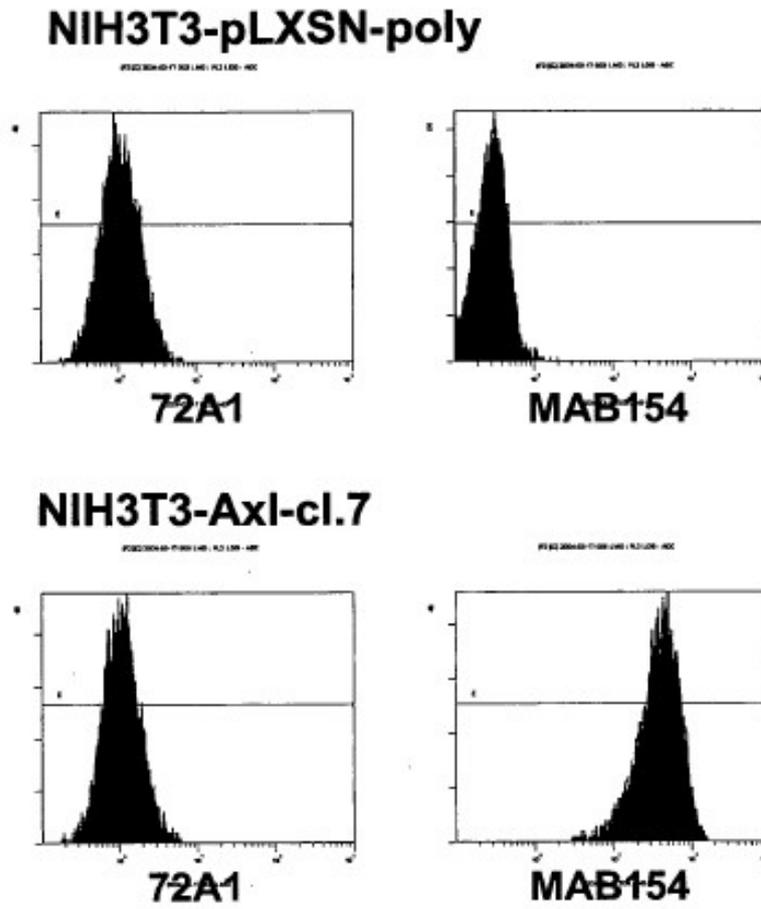


Figura 3

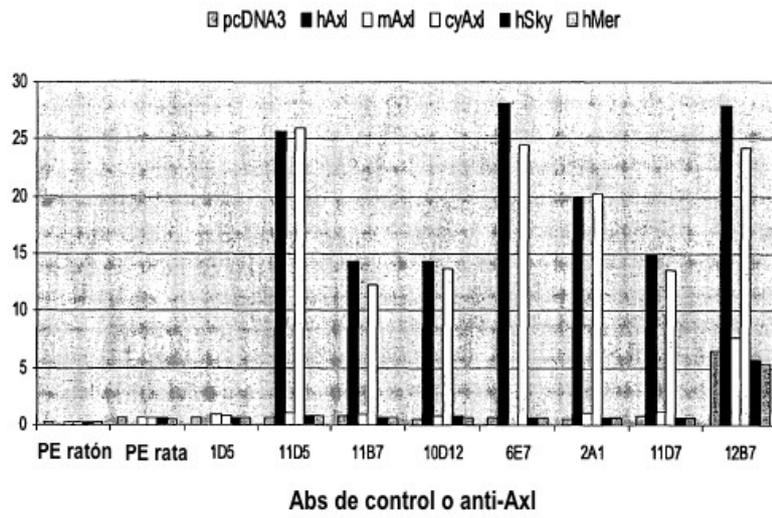
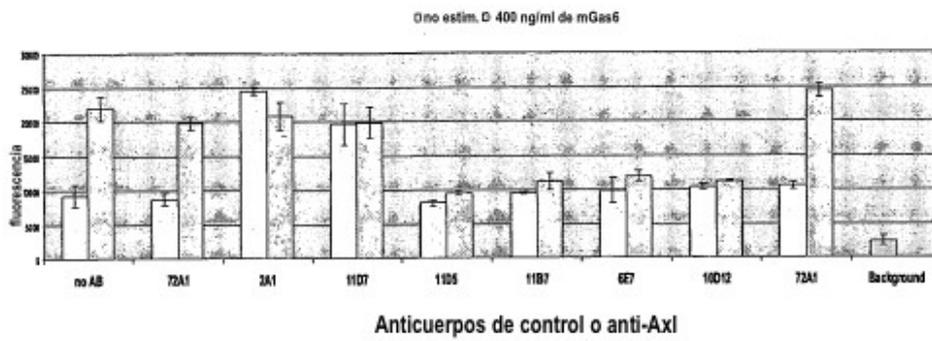


Figura 4

A NIH3T3-Axl cl.7



B NCI-H292

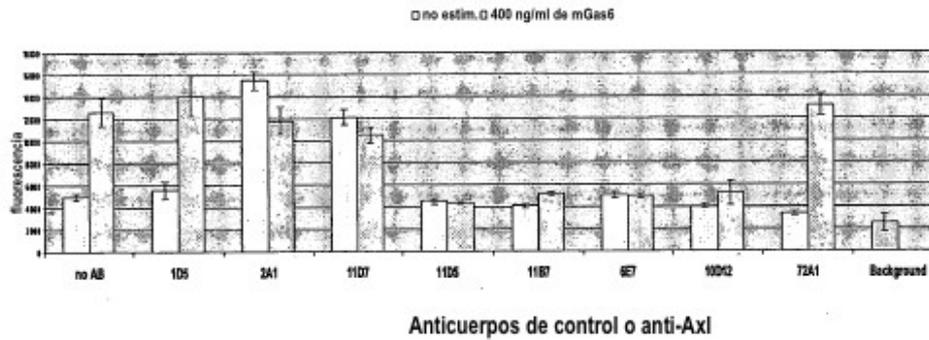


Figura 5

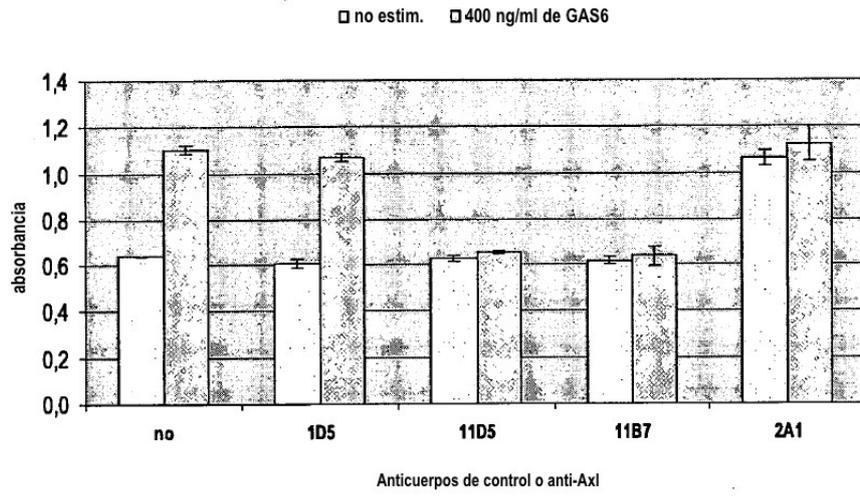
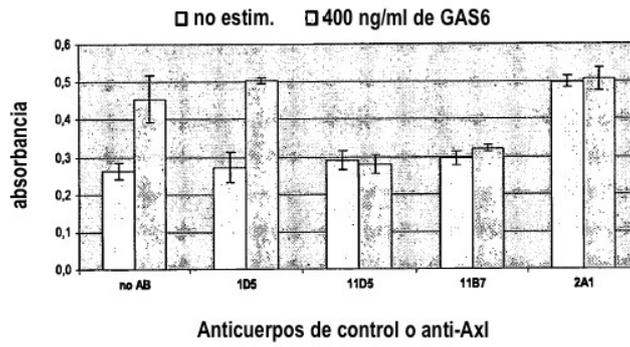


Figura 6

A NIH3T3-Axl cl.7



B CaLu-1

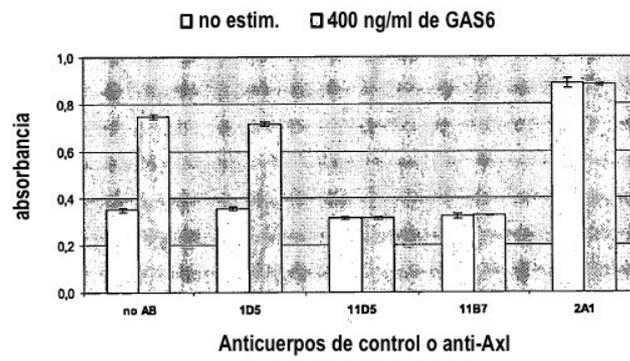
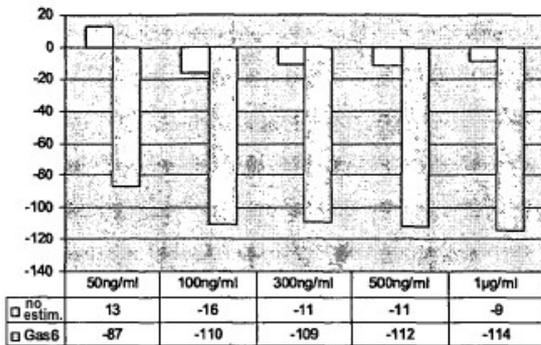


Figura 7

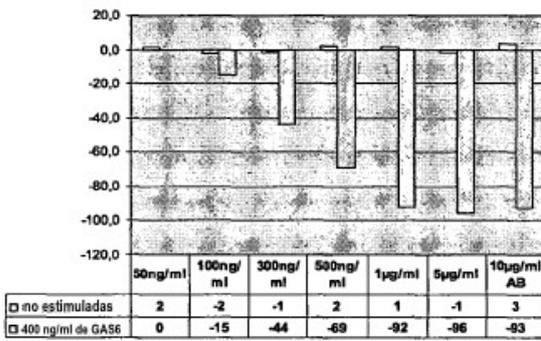
11B7 (rIgG2a)



ch11B7 (hIgG2)



11D5 (rIgG2a)



ch11D5 (hIgG2)

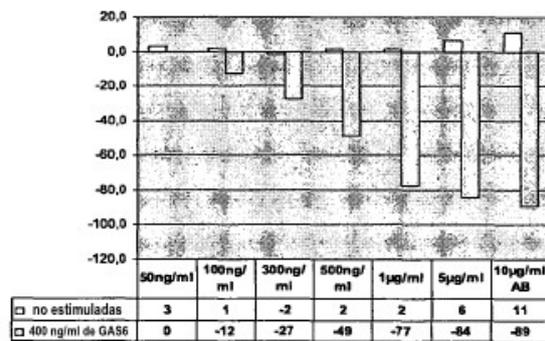


Figura 8

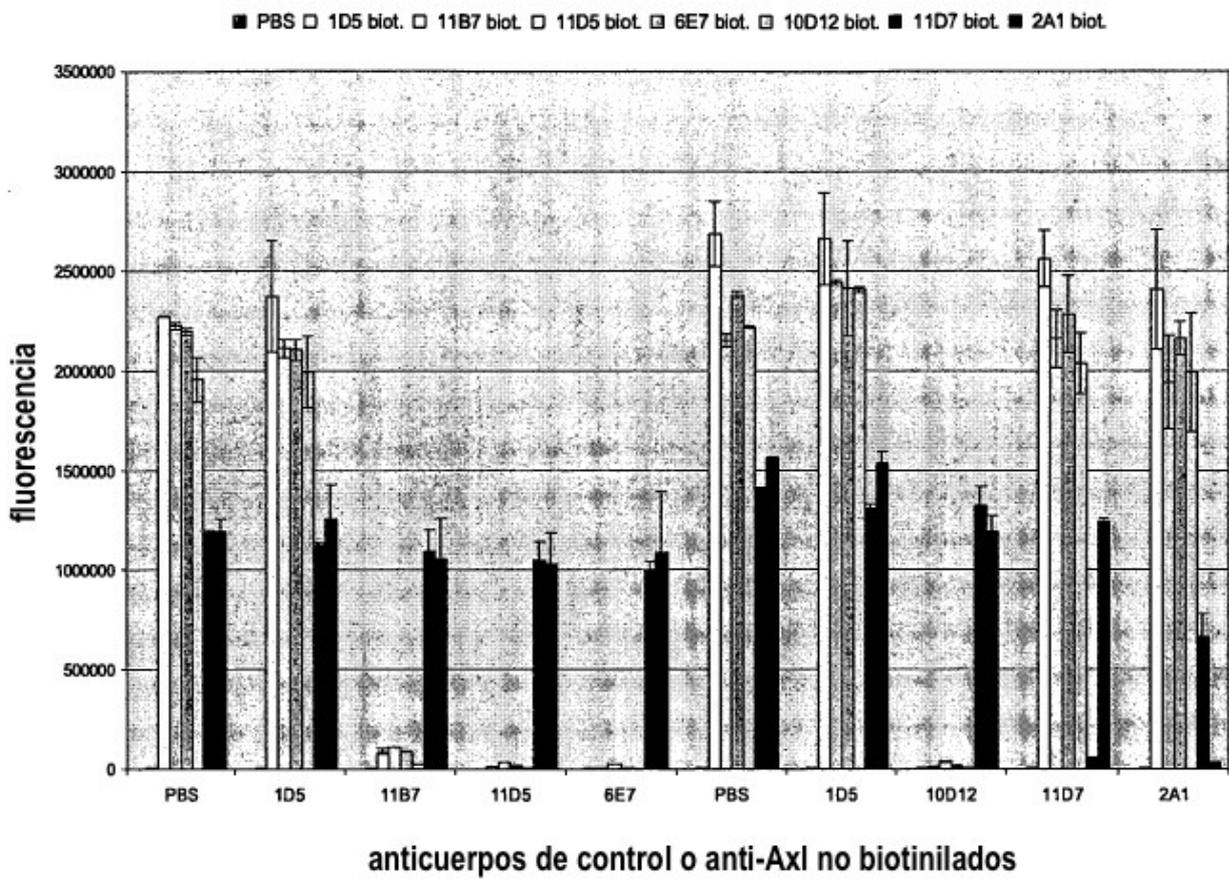


Figura 9

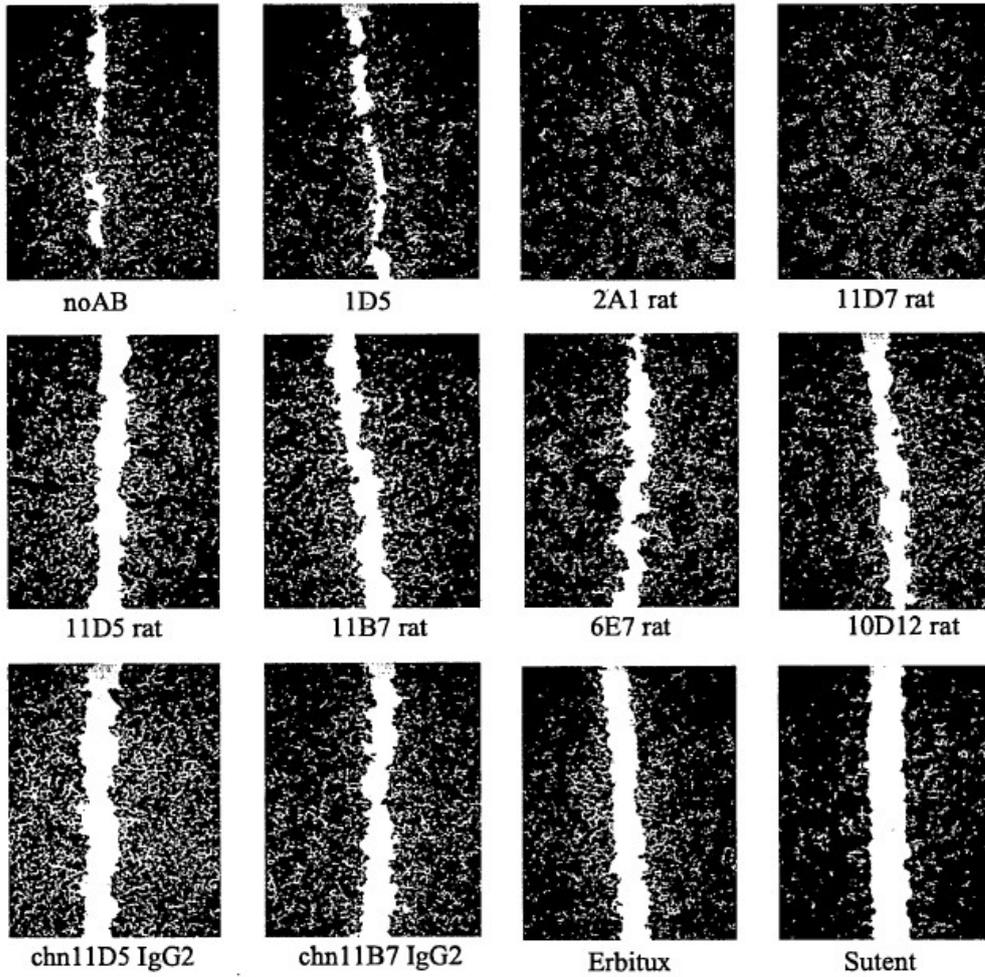


Figura 10

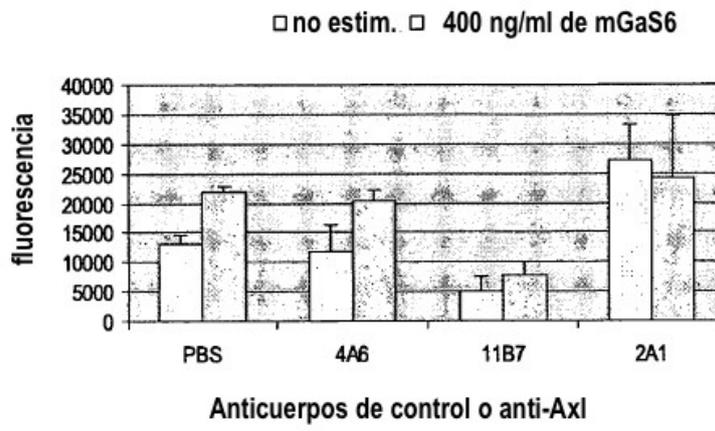


Figura 11

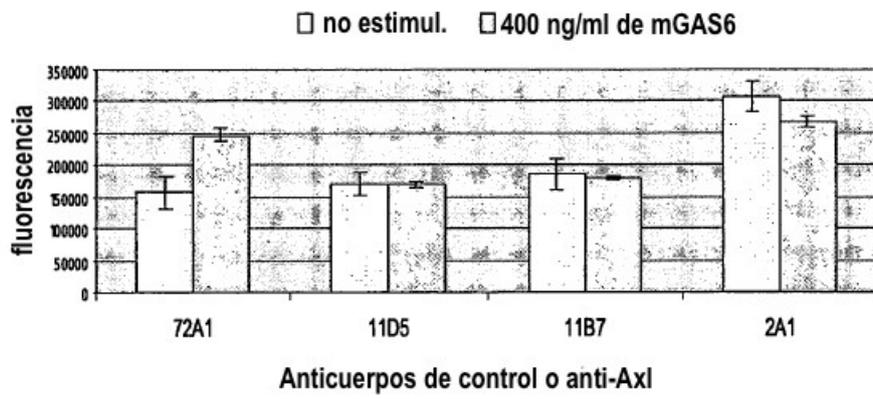


Figura 12

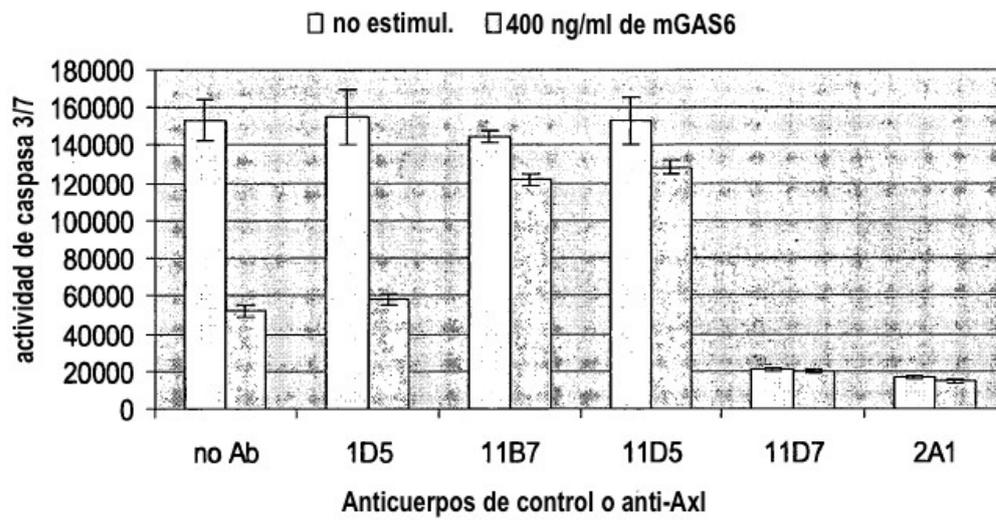
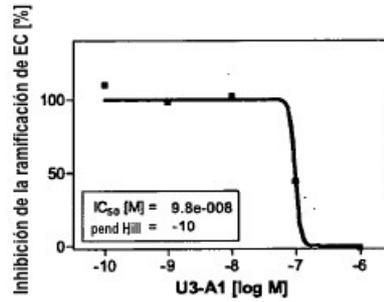
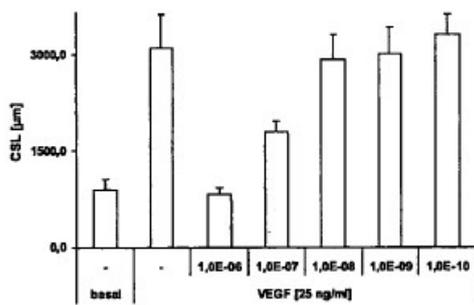


Figura 13

A 11B7



B 11D5

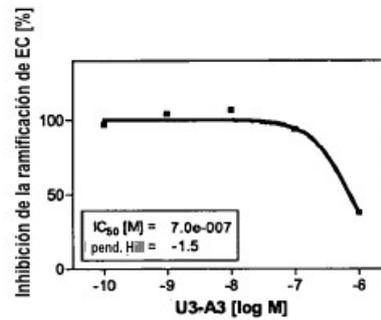
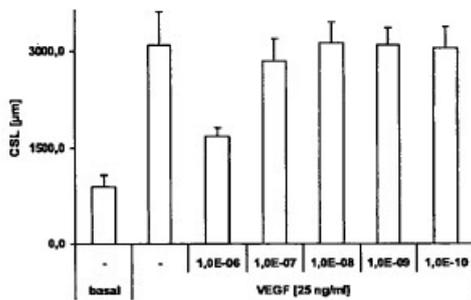


Figura 14

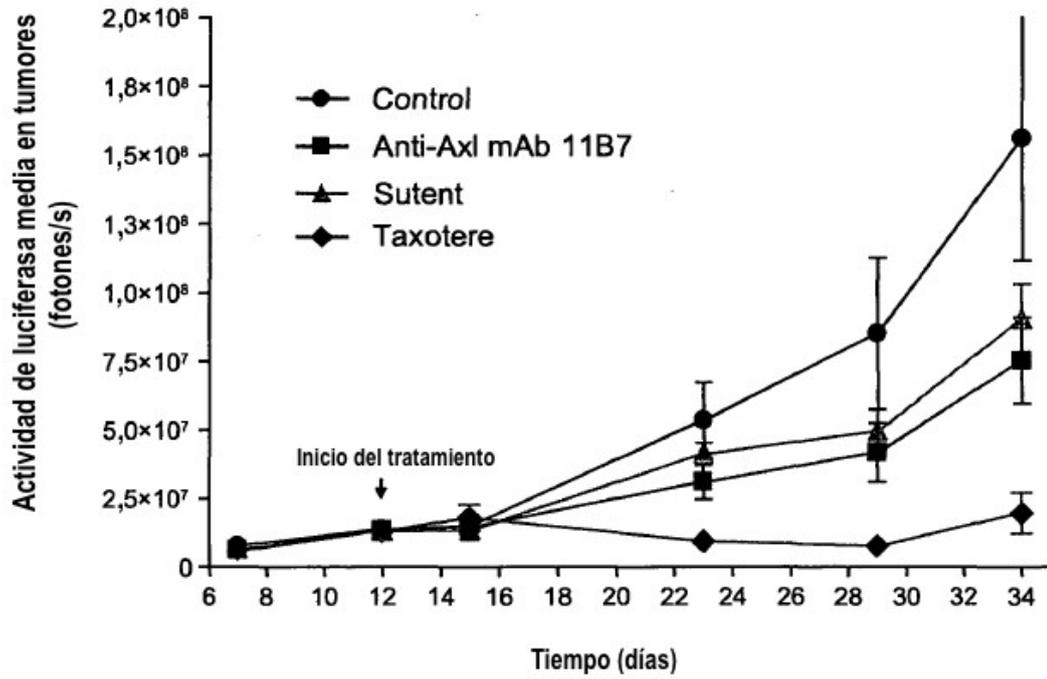


Figura 15

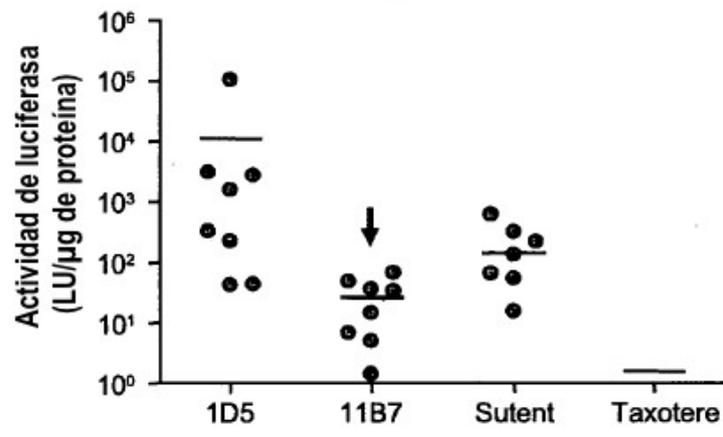
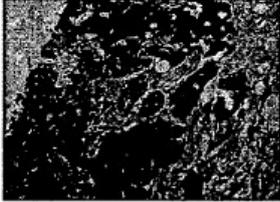
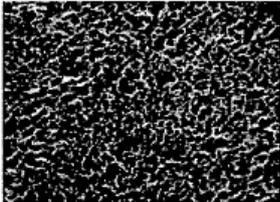


Figura 16

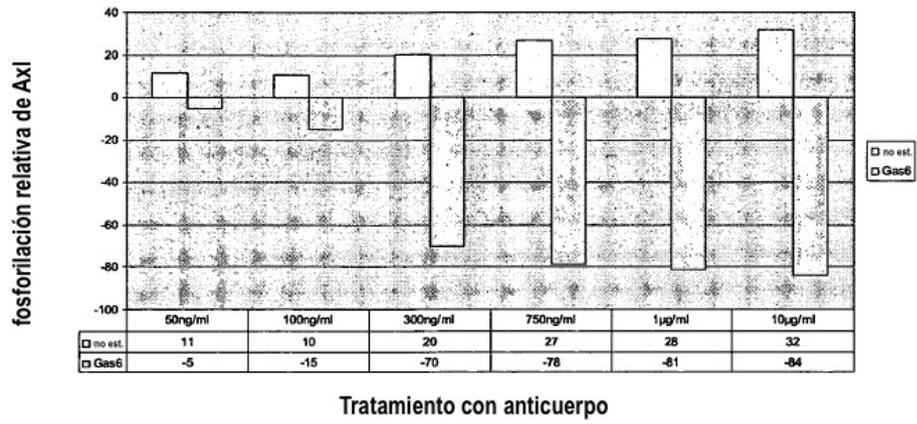
| A | Intensidad ≥ 1 | | B |
|-----------------|---------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| | Tumor | Adyacente | |
| Mama | 3/3 | 0/3 |  |
| Colon | 3/11 | 0/11 | |
| Pulmón | 2/9 | 0/9 |  |
| Riñón | 0/10 | 0/10 | |
| Linfoma fol. | 0/12 | 0/3 | |
| Piel/Melanoma | 1/13 | 0/12 | |
| Ovario | 4/11 | 0/9 | |
| Próstata | 0/11 | 0/9 | |
| Páncreas | 2/9 | 0/11 | |
| Esófago | 4/10 | 0/10 | |
| Barrett | 4/11 | 0/9 | |
| Estómago | 6/10 | 0/7 | |
| Vejiga urinaria | 8/10 | 0/10 | |
| Cuello uterino | 7/9 | 0/9 | |
| Hígado | 3/9 | 0/7 | |
| Tiroides | 5/9 | 0/11 | |
| Cabeza y cuello | 8/20 | 0/17 | |

Cáncer de mama

Carcinoma gástrico de células en anillo de sello

Figura 17

A 11B7 (rlgG1)



B ch11B7 (hlgG1)

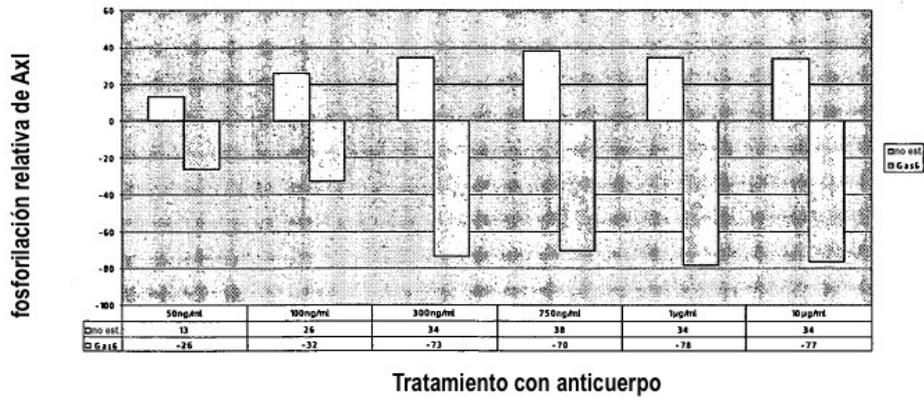
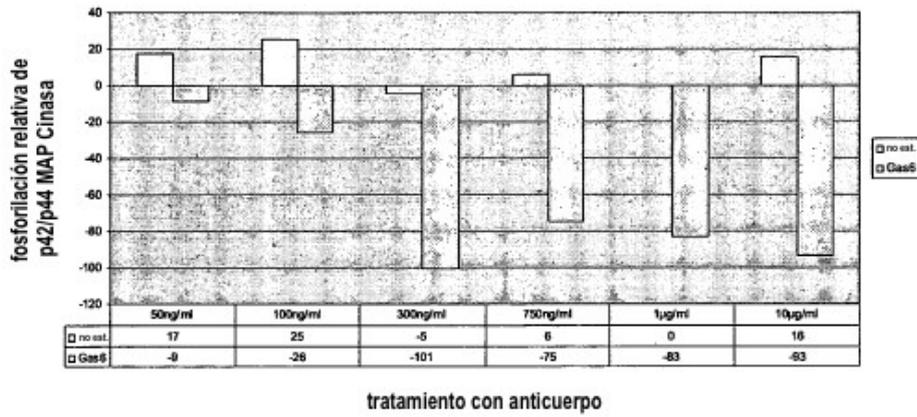


Figura 18

A 11B7 (rIgG1)



B ch11B7 (hIgG1)

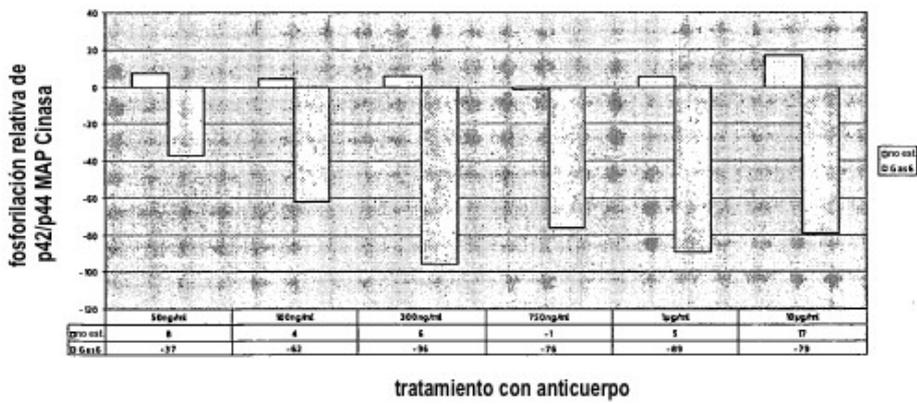


Figura 19

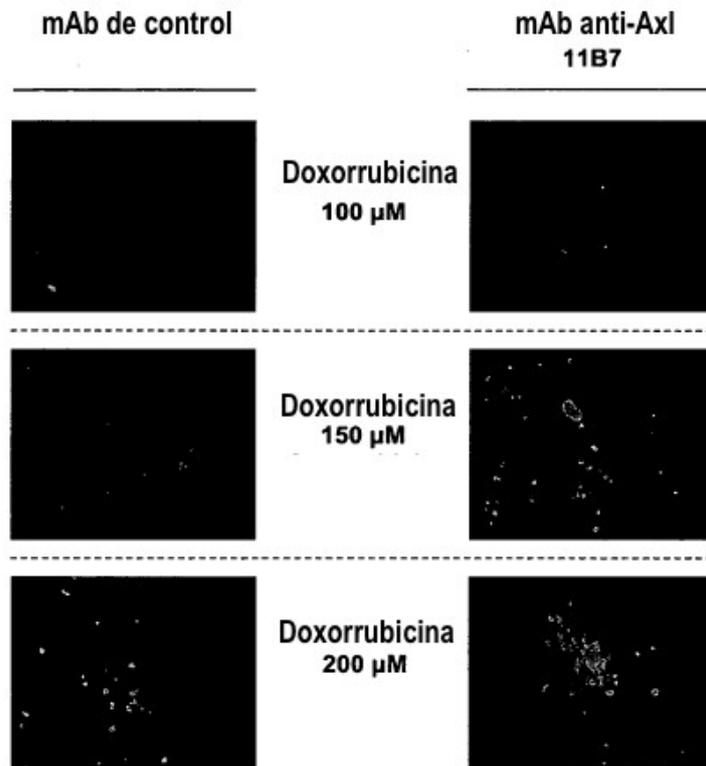
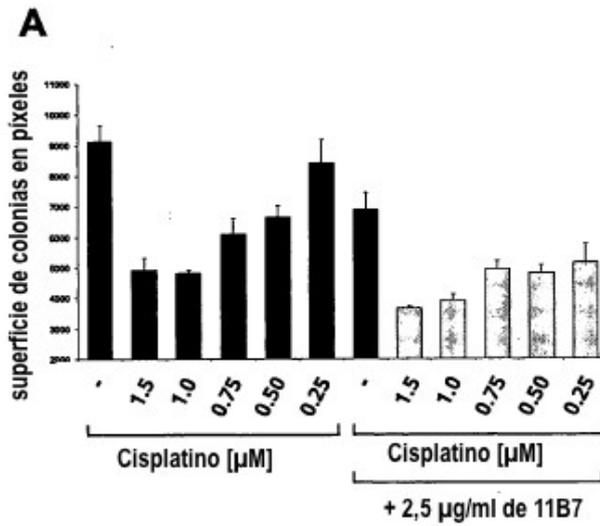
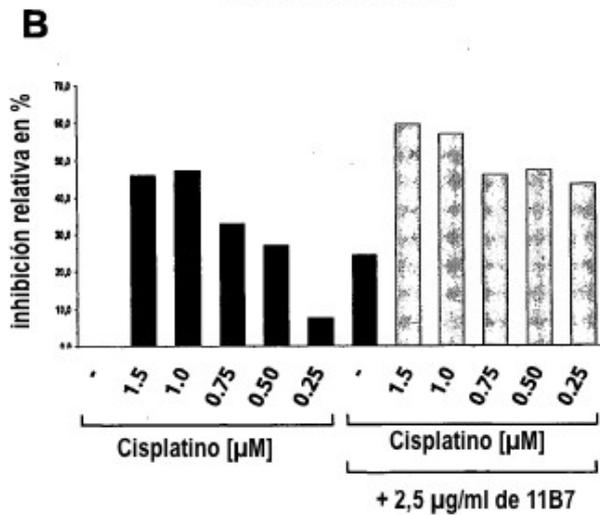


Figura 20



superficie de colonias,
números absolutos



superficie de colonias,
números absolutos