

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 428**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015 PCT/EP2015/065900**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005593**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015 E 15738884 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3169706**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a AXL**

30 Prioridad:

11.07.2014 DK 201400380
01.09.2014 DK 201400489
22.12.2014 DK 201400746
12.05.2015 DK 201500283

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2020

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)
Kalvebod Brygge 43
1560 Copenhagen V, DK

72 Inventor/es:

BREIJ, ESTHER;
SATIJN, DAVID;
VAN DEN BRINK, EDWARD NORBERT;
VERZIJL, DENNIS;
DE JONG, ROB N.;
PARREN, PAUL y
VAN DIJKHUIZEN RADERSMA, RIEMKE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 774 428 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 que se unen a AXL

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a AXL, a productos inmunoconjugados, a composiciones que comprenden tales anticuerpos o productos inmunoconjugados, y a usos de dichos anticuerpos y productos inmunoconjugados.

10

Antecedentes

La subfamilia TAM de Tirosina Quinasas Receptoras (RTK) de mamíferos consiste en AXL, Tyro3 y Mer. AXL es una proteína transmembrana de 104-140 kDa que tiene capacidades transformadoras [1]. La AXL puede activarse al unirse a su ligando, el factor 6 específico de la detención del crecimiento dependiente de vitamina K (Gas6). La unión de Gas6 a AXL conduce a la dimerización de AXL, la autofosforilación y la posterior activación de las vías de señalización intracelular, tales como las cascadas PI3K/AKT, proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), STAT y NF- κ B [2]. En las células cancerosas, AXL mejora la motilidad, la invasión, la migración de las células tumorales y está implicada en la transición epitelio mesénquima (EMT) [3]. Además, la expresión de AXL ha sido implicada en la resistencia a la quimioterapia y la terapia dirigida, tal como la terapia dirigida al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) (Wilson 2014, Brand 2013, Zhang 2012) o los inhibidores de la vía B-raf (BRAF) (Muller, 2014).

15

20

El dominio extracelular de los miembros de la familia del receptor TAM está compuesto por una combinación de dos dominios similares a inmunoglobulina N-terminal (Ig) y dos repeticiones de fibronectina Tipo III (FNIII) [1]. El ligando Gas6 se une a los dominios de tipo Ig I y II de AXL [14].

25

Se ha informado sobre la regulación por incremento de AXL en una variedad de cánceres, incluidos el cáncer gástrico, de próstata, de ovario y de pulmón [1]. Además, AXL se expresa de manera anormalmente alta en los cánceres de mama y pancreáticos y se asocia significativamente con una mayor frecuencia de metástasis y con una escasa supervivencia general [2].

30

La inhibición dirigida de RTK puede ser eficaz como terapia antitumoral y/o metastásica. Tal inhibición dirigida de AXL y/o del ligando Gas6 comprende moléculas pequeñas y anticuerpos anti-AXL [3]. Se han descrito anticuerpos anti-AXL que atenúan el crecimiento de xenoinjerto de carcinoma de pulmón de células no pequeñas *in vivo* mediante regulación negativa de la expresión del receptor, reduciendo la proliferación de células tumorales e induciendo la apoptosis [4]. Además, se han descrito varios anticuerpos monoclonales que bloquean la unión del ligando Gas6 a AXL [2], [5] y [7].

35

Los anticuerpos anti-AXL se han descrito previamente [8]-[13].

40

Adicionalmente US 2012/121587 describe anticuerpos anti-AXL Ax225, Ax284, Ax7 y Ax51. Ax225 se une a FND1 de AXL, Ax284 se une a FND1 e IgD2, Ax7 y Ax51 se unen a IgD2. Ax225 induce la modulación por disminución de AXL y tiene propiedades antitumorales.

45

El documento WO 2012/175691 describe el anticuerpo anti-AXL de ratón 20G7-D9, que no bloquea la unión de GAS6 e inhibe la fosforilación de AXL inducida por ligando y la proliferación del cáncer. El epítipo de 20G7-d9 es conformacional y consiste en 3 péptidos localizados en la IgD2, en el FND1 y en el FND2.

50

El documento WO 2012/175692 describe un anticuerpo anti-AXL de ratón con una Kd de 1,6 nM, que no bloquea la unión de GAS6. El anticuerpo inhibe la proliferación de AXL inducida por ligando, la migración celular y la proliferación de células cancerosas. *In vivo*, reduce el crecimiento de cáncer de mama y cáncer de páncreas triple negativo, y se une a un epítipo conformacional que comprende 2 péptidos localizados en FND1 y FND2, residuos 229-235 y 378-390.

55

El documento WO 2011/159980 describe anticuerpos anti-AXL YW327.42 y YW327.6S2 que bloquean la función AXL con una Kd de menos de 2,5 nM. YW327.42 no bloquea la unión de GAS6, mientras que YW327.6S2 bloquea la unión del ligando. YW327.42 se une dentro de los aminoácidos 1-324 y YW327.6S2 se une dentro de los residuos 1-134. YW327.42 compite con el anticuerpo 12A11, pero no con el anticuerpo 3G9, mientras que YW327.6S2 no compite con ninguno de ellos por unirse al AXL. YW327.42 y YW327.6S2 reducen el crecimiento tumoral.

60

Leconnet et al., Oncogene 2013, pág. 55405-5414 describen el uso de anticuerpos inhibidores anti-AXL D9 y E8, que también se internalizan para reducir el crecimiento de tumores pancreáticos. Ambos anticuerpos inducen eficazmente ADCC y no compiten con GAS6 para unirse a AXL.

WO 2011/014457 describe el anticuerpo anti-AXL 12A11, que no afecta a la unión del ligando y se une a FND1 de AXL. 12A11 reduce el crecimiento de las células tumorales.

5 Liu et al., Journal of the American Chemical Society, vol. 116, 2, pág. 297-305 describen el anticuerpo anti-AXL Mab173, que reduce el crecimiento tumoral, aumenta la apoptosis de las células tumorales y disminuye el nivel de proteína AXL en los tumores. El Mab173 reduce AXL mediante endocitosis y se une al primer FND.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de anticuerpos anti-AXL que tengan una actividad antitumoral mejorada.

10 Compendio de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos anti-AXL. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a AXL, en donde el anticuerpo no compite por la unión de AXL con el ligando 6 Específico de la Detención del Crecimiento (Gas6) y el anticuerpo comprende al menos una región de unión, que comprende una región pesada variable (VH) y una región de cadena ligera variable (VL) seleccionada del grupo que consiste en:

- 20 a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**;
- b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;
- 25 c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 101, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**;
- d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 128, XAS, en donde X es D o G, y 129, respectivamente, **[613/613-08]**; y
- 30 e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N°: 93, 126 y 127, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente **[613/608-01/610-01/620-06]**.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo según la invención, y una segunda región de unión que se une a una diana o epítipo diferente que dicha primera región de unión a antígeno.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o anticuerpo biespecífico según la invención, y un radical terapéutico, tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico, una citocina, un inmunosupresor, antibiótico o un radioisótopo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo, anticuerpo biespecífico o producto inmunoconjugado según la invención.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, anticuerpo biespecífico o producto inmunoconjugado según la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende una o más construcciones de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula anfitriona que comprende un vector de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un hibridoma que produce el anticuerpo según la invención.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere al anticuerpo, anticuerpo biespecífico o producto inmunoconjugado según la invención para uso como medicamento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al anticuerpo, anticuerpo biespecífico o producto inmunoconjugado de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo comprende las etapas a) cultivar una célula anfitriona o hibridoma de acuerdo con la invención, y b) purificar el anticuerpo del medio de cultivo.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo o anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de anticuerpo contra AXL, o una célula que expresa AXL, en una muestra que comprende las etapas de a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo, anticuerpo biespecífico, producto inmunoconjugado de acuerdo con la invención, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo, anticuerpo biespecífico o producto inmunoconjugado y AXL; y b) analizar si se ha formado un complejo.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para detectar la presencia de antígeno AXL, o una célula que expresa AXL, en una muestra que comprende i) un anticuerpo, anticuerpo biespecífico o producto inmunoconjugado de acuerdo con la invención; y ii) instrucciones de uso del kit.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo antiidiotípico que se une a un anticuerpo anti-AXL según la invención.

Breve descripción de las figuras

25 **Figura 1:** Curvas de unión de anticuerpos anti-AXL a células HEK293 transfectadas con (A) AXL-ECD humano, (B) AXL-ECD de cinomolgo, o (C) AXL-ECD de ratón. Los datos mostrados son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 2: La unión de anticuerpos anti-AXL a quimeras de AXL de ratón-ser humano se realizó como se describe en el Ejemplo 3. Se probaron las siguientes proteínas quiméricas AXL de *Homo sapiens* (hsAXL) y AXL de *Mus musculus* (mmAXL): (A) hsAXL y simulada, (B) hsAXL-mmECD, (C) hsAXL-mmIlg1, (D) hsAXL-mmIlg2, (E) hsAXL-mmFN1, (F) hsAXL-mmFN2.

30 **Figura 3:** Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos anti-AXL en células A431. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por anticuerpos anti-AXL en células A431 se determinó como se describe en el Ejemplo 4.

Figura 4: Características de unión de los productos conjugados de anticuerpo contra AXL-fármaco (AXL-ADC). La unión de AXL-ADC en células HEK293T transfectadas transitoriamente con AXL humana se determinó como se describe en el Ejemplo 5. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia medias (MFI) de un experimento representativo.

Figura 5: Citotoxicidad *in vitro* inducida por productos conjugados de anticuerpo contra AXL-fármaco. La inducción de citotoxicidad por productos conjugados de anticuerpo contra AXL-fármaco se determinó como se explica en el Ejemplo 6.

40 **Figura 6:** Variantes VH y VL de anticuerpo que permiten la unión a AXL. Se alinearon anticuerpos con regiones VL o VH idénticas y las diferencias en las secuencias VH (Figuras A-D) o VL (Figura E), respectivamente, se identificaron e indicaron mediante recuadros en las figuras. Las regiones CDR están subrayadas.

Figura 7: La inducción de citotoxicidad por ADC en células LCLC-103H se determinó como se describe en el Ejemplo 8.

Figura 8: Actividad antitumoral por anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en un modelo de xenoinjerto LCLC-103H terapéutico como se describe en el Ejemplo 9.

Figura 9: Tinción inmunohistoquímica de secciones de tumor PAXF1657 congeladas (modelo PDX de cáncer de páncreas) utilizando un conjunto de anticuerpos monoclonales AXL como se describe en el Ejemplo 10.

50 **Figura 10:** (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con AXL-ADC del modelo PAXF1657. Un Humab AXL no conjugado (C) y un ADC no dirigido (D) no muestran actividad antitumoral, lo que indica que la capacidad terapéutica de AXL-ADC dependía de la actividad citotóxica de MMAE y de la unión a la diana, las barras de error representan E.T.M.

Figura 11: La unión de los anticuerpos anti-AXL a las quimeras AXL humanas de ratón se realizó como se describe en el Ejemplo 11. Se probaron las siguientes proteínas quiméricas AXL de *Homo sapiens* (hsAXL) y AXL de *Mus musculus* (mmAXL): (A) hsAXL y simulada, (B) hsAXL-mmECD, (C) hsAXL-mmIlg1, (D) hsAXL-mmIlg2, (E) hsAXL-mmFN1, (F) hsAXL-mmFN2.

Figura 12: Unión de Gas6 humano (hGas6) en células A431 que se habían incubado previamente con anticuerpos que se unen al dominio Ig1 de AXL. Los datos mostrados son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo.

Figura 13: Actividad antitumoral de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en un modelo terapéutico de xenoinjerto A431, que produce altos niveles de Gas6 endógeno, como se describe en el Ejemplo 13. Los paneles A y B muestran los resultados de 2 experimentos independientes.

Figura 14: Actividad antitumoral de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en un modelo de

xenoinjerto LCLC-103H terapéutico, que expresa bajos niveles de Gas6 endógeno, como se describe en el Ejemplo 13. Los paneles A y B muestran los resultados de 2 experimentos independientes.

Figura 15: La inducción de citotoxicidad por AXL-ADC en células A431 (A) y células MDA-MB231 (B) se determinó como se describe en el Ejemplo 8.

Figura 16. Tinción de AXL en cáncer de tiroides, esófago, ovario, mama, pulmón, páncreas, cervical y endometrial. La intensidad de tinción (DO) promedio de AXL de las células positivas para AXL se representa en el eje X, y el porcentaje de células tumorales positivas para AXL se representa en el eje Y. Cada punto representa un núcleo tumoral, derivado de un paciente individual.

Figura 17. Ejemplos representativos de núcleos tumorales inmunoteñidos con AXL para diferentes indicaciones tumorales.

Figura 18. Los anticuerpos contra AXL se unen específicamente a AXL, pero no a otros miembros de la familia de receptores TAM. Unión de anticuerpos HuMab-AXL a células HEK293 transfectadas con AXL humana (A), MER humana (B), TYRO3 humana (C) o células HEK293 no transfectadas (D). Para confirmar la expresión adecuada de las células transfectadas, las células HEK293F no transfectadas y las células transfectadas con AXL (E), MER (F) o TYRO3 (G) se tiñeron con anticuerpos específicos de MER y TYRO3. Los datos mostrados son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 15.

Figura 19. Detección de anticuerpos contra AXL en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales que se habían incubado con anticuerpos contra AXL durante 1 hora a 4°C, seguido de una incubación durante la noche a 4°C o 37°C. Tanto en las células MDA-MB-231 (A y B) como en las células Calu-1 (C y D), se detectó más anticuerpo en la membrana plasmática de las células que se habían incubado a 4°C que en las células que se habían incubado a 37°C, lo que ilustra la internalización del anticuerpo unido a la membrana a 37°C.

Figura 20. Media geométrica de la intensidad de fluorescencia de células LCLC-103H después de la incubación con anticuerpos contra AXL que habían sido complejados con Fab-TAMRA/QSY7. IgG1-b12 y Fab-TAMRA/QSY7 solo se incluyeron como controles negativos.

Figura 21. (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de PDX de cáncer de esófago ES0195. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE se incluyeron como anticuerpo de control de isotipo y ADC de control de isotipo, respectivamente. (B) Tamaño del tumor en ratones individuales el día 32 después de la inyección de células tumorales MDA-MB-231-luc D3H2LN en las almohadillas de grasa mamaria de ratones SCID hembra. * p <0,05; ** p <0,0001

Figura 22. Efecto terapéutico de AXL-ADC en un modelo de xenoinjerto de cáncer de cuello uterino derivado del paciente. (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE en el modelo PDX de cáncer de cuello uterino CEXF 773. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE se incluyeron como anticuerpo de control de isotipo y control de isotipo ADC, respectivamente. (B) Tamaño del tumor en ratones individuales el día 28 después del inicio del tratamiento en el modelo PDX de cáncer cervical CEXF 773. * p <0,001.

Figura 23. Actividad terapéutica de AXL-ADC en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama ortotópico. (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE en un modelo de xenoinjerto ortotópico MDA-MB-231-luc D3H2LN. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE se incluyeron como anticuerpo de control de isotipo y ADC de control de isotipo, respectivamente. (B) Tamaño del tumor en ratones individuales el día 32 después de la inyección de células tumorales MDA-MB-231-luc D3H2LN en las almohadillas de grasa mamaria de ratones SCID hembra. * p <0,001.

Figura 24. Citotoxicidad de IgG1-AXL-107-vcMMAE en líneas celulares tumorales humanas con diferentes niveles de expresión de AXL en la membrana plasmática. La expresión de AXL en la membrana plasmática de las líneas celulares tumorales humanas se evaluó mediante el análisis Qifikit, y la citotoxicidad de IgG1-AXL-107-vcMMAE se expresó como el porcentaje de células tumorales viables que permanecieron en los cultivos celulares después de la exposición a 1 µg/ml IgG1-AXL-107-vcMMAE.

Descripción detallada

Anticuerpos

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a AXL, en donde el anticuerpo no compite por la unión a AXL con el ligando 6 Específico de la Detención del Crecimiento (Gas6) y el anticuerpo comprende al menos una región de unión, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) seleccionada del grupo que consiste en:

a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**;

b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;

c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 101, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**;

d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 128, XAS, en donde X es D o G, y 129, respectivamente, **[613/613-08]**; y

e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N°: 93, 126 y 127, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente **[613/608-01/610-01/620-06]**.

Se pretende que el término "anticuerpo" como se emplea en la presente memoria se refiera a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de las mismas, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno bajo condiciones fisiológicas y/o específicas del tumor típicas con una semivida de períodos de tiempo significativos, tales como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro período relevante funcionalmente definido (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, mejorar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o el tiempo suficiente para que el anticuerpo se internalice). La región de unión (o dominio de unión que se puede utilizar en la presente memoria, ambos con el mismo significado) que interactúa con un antígeno, comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del anfitrión, incluidas varias células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente en la vía clásica de activación del complemento. Como se indicó anteriormente, el término anticuerpo como se emplea en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de interactuar específicamente, por ejemplo, unirse, al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo completo. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en [15]; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb [16], que consiste esencialmente en un dominio VH y también se denomina anticuerpo de dominio [17]; (vi) anticuerpos de camélidos o nanocuerpos [18] y (vii) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, estos se pueden unir, mediante métodos recombinantes, por medio de un conector sintético que les permite formarse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla (scFv), véanse, por ejemplo, [19] y [20]). Tales anticuerpos de cadena sencilla están englobados dentro del término anticuerpo a menos que se indique lo contrario o se indique claramente por el contexto. Aunque tales fragmentos se incluyen generalmente dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son características únicas de la presente invención, que exhiben diferentes propiedades biológicas y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se analizan adicionalmente en la presente memoria. También se debe entender que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, así como 'fragmentos de anticuerpos' o 'fragmentos de los mismos' que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados por medio de cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes, y que retienen la capacidad de conjugarse con una toxina. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

Se pretende que el término "cadena pesada de inmunoglobulina" o "cadena pesada de una inmunoglobulina" como se emplea en la presente memoria se refiera a una de las cadenas pesadas de una inmunoglobulina. Una cadena pesada está compuesta típicamente por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como VH) y una región constante de la cadena pesada (abreviada en la presente memoria como CH) que define el isotipo de la inmunoglobulina. La región constante de la cadena pesada típicamente está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. El término "inmunoglobulina" como se emplea en la presente memoria pretende referirse a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas de polipéptidos, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro potencialmente interconectados por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas está bien caracterizada (véase, por ejemplo, [21]). Dentro de la estructura de la inmunoglobulina, las dos cadenas pesadas están interconectadas a través de enlaces disulfuro en la llamada "región bisagra". Al igual que las cadenas pesadas, cada

cadena ligera está compuesta típicamente por varias regiones; una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera típicamente está compuesta por un dominio, CL. Además, las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden tener hipervariabilidad en la secuencia y/o la forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las secuencias CDR se definen de acuerdo con IMGT (véanse [22] y [23]).

El término "región de unión a antígeno" o "región de unión" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una región de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno. El antígeno puede ser cualquier molécula, tal como un polipéptido, p. ej. presente en una célula, bacteria o virión. Los términos "antígeno" y "diana" pueden, a menos que el contexto lo contradiga, utilizarse indistintamente en el contexto de la presente invención.

El término "unión" como se emplea en la presente memoria se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno o diana predeterminados, típicamente con una afinidad de unión correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menos, p. ej. 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, aproximadamente 10^{-10} M o menos, o aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos cuando se determina mediante, por ejemplo, la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIAcore 3000 que utiliza el antígeno como ligando y la proteína como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo al menos 100.000 veces menor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D de la proteína, de modo que cuando la K_D de la proteína es muy baja (es decir, la proteína es altamente específica), la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces. El término " K_D (M)", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta, y se obtiene dividiendo k_D por k_a .

El término " k_D (seg^{-1})", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Dicho valor también se conoce como valor k_{off} o velocidad de disociación.

El término " k_a ($\text{M}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$)", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno concreta. Dicho valor también se conoce como valor k_{on} o velocidad de asociación.

El término " K_A (M^{-1})", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta y se obtiene dividiendo k_a por k_D .

El término "AXL", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la proteína titulada AXL, que también se conoce como UFO o JTK11, una proteína de 894 aminoácidos con un peso molecular de 104-140 kDa que forma parte de la subfamilia TAM de Tirosina Quinasas Receptoras (RTK) de mamíferos. El peso molecular es variable debido a diferencias potenciales en la glicosilación de la proteína. La proteína AXL consta de dos dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (tipo Ig) en el extremo N-terminal de la proteína, dos dominios fibronectina tipo III (FNIII) extracelulares de membrana proximales, un dominio transmembrana y un dominio quinasa intracelular. AXL se activa tras la unión de su ligando Gas6, mediante interacciones homofílicas independientes del ligando entre dominios extracelulares de AXL, mediante autofosforilación en presencia de especies reactivas de oxígeno [24] o mediante transactivación a través de EGFR (Meyer, 2013), y se expresa de manera aberrante en varios tipos de tumores. En seres humanos, la proteína AXL está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 130 (proteína AXL humana: Swissprot P30530; proteína AXL de cinomolgo: acceso de Genbank HB387229.1)).

El término "interacciones homofílicas independientes del ligando", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la asociación entre dos moléculas de AXL (expresadas en células vecinas) que se produce en ausencia del ligando.

El término "anticuerpo que se une a AXL" como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier anticuerpo que se une a un epítipo en la porción extracelular de AXL.

El término "epítipo" significa un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos generalmente consisten en agrupaciones superficiales de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar o una combinación de las mismas y generalmente tienen características estructurales

tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender residuos de aminoácidos que están directamente implicados en la unión, y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que están bloqueados o cubiertos eficazmente por el péptido de unión al antígeno específico (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión al antígeno específico).

El término "ligando", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una sustancia, tal como una hormona, péptido, ion, fármaco o proteína, que se une específica y reversiblemente a otra proteína, tal como un receptor, para formar un complejo más grande. La unión del ligando a un receptor puede alterar su conformación química y determina su estado funcional. Por ejemplo, un ligando puede funcionar como agonista o antagonista.

El término "6 Específica de la Detención del Crecimiento" o "Gas6", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una proteína de 721 aminoácidos, con un peso molecular de 75-80 kDa, que funciona como un ligando para la familia de receptores TAM, incluido AXL. Gas6 está compuesta por una región N-terminal que contiene múltiples residuos de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla), que son responsables de la interacción específica con la membrana de fosfolípidos cargada negativamente. Aunque el dominio Gla no es necesario para la unión de Gas6 a AXL, es necesario para la activación de AXL. Gas6 también se puede denominar "ligando para AXL".

Los términos "anticuerpo monoclonal", "Ab monoclonal", "composición de anticuerpo monoclonal", "mAb" o similares, como se emplean en la presente memoria, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión única para un epítipo concreto. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico o transcromosómico no humano, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera, fusionado a una célula inmortalizada.

En una realización, la unión máxima de anticuerpos en presencia de Gas6 es al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 97%, tal como al menos 99%, tal como 100%, de unión en ausencia de Gas6, según lo determinado por el método descrito en el Ejemplo 2.

La competición entre anti-AXL y el ligando Gas6 a AXL se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 bajo el título "Interferencia de unión anti-AXL con unión a Gas6". Por lo tanto, la presente descripción proporciona un anticuerpo que no compite por la unión a AXL con el ligando Gas6, en donde la competición por la unión se determina en un ensayo que comprende las etapas de

- i) incubar células que expresan AXL con Gas6,
- ii) añadir los anticuerpos anti-AXL que se deben probar,
- iii) añadir un reactivo secundario marcado con fluorescencia que detecte anticuerpos anti-AXL y
- iv) analizar las células mediante FACS.

El anticuerpo puede ser uno que no compita por la unión con el ligando Gas6, en donde la competición por la unión se determina en un ensayo que comprende las etapas de

- i) incubar células que expresan AXL con anticuerpos anti-AXL,
- ii) añadiendo Gas6,
- iii) añadir un reactivo secundario marcado con fluorescencia que detecta Gas6, y
- iv) analizar las células mediante FACS.

En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión (K_D) en el intervalo de $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M para AXL, y en donde dicha afinidad de unión se mide utilizando una interferometría de Biocapa utilizando el dominio extracelular de AXL soluble.

La afinidad de unión se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2. Por lo tanto, el anticuerpo puede tener una afinidad de unión de $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M al antígeno, en donde la afinidad de unión se determina mediante un método que comprende las etapas de;

- i) cargar biosensores de Captura anti-Fc humano con anticuerpos anti-AXL, y
- ii) determinar la asociación y disociación del dominio extracelular AXL recombinante soluble mediante interferometría de Biocapa a diferentes concentraciones.

El término "dominio extracelular de AXL recombinante soluble" como se emplea en la presente memoria, se refiere a

un dominio extracelular de AXL que se ha expresado de forma recombinante. Debido a la ausencia del dominio transmembrana e intracelular, el dominio extracelular de AXL recombinante no está unido, p. ej. a una superficie celular y permanece en solución. Es bien conocido cómo expresar una proteína de forma recombinante, véase p. ej. [25], y, por lo tanto, está dentro del conocimiento del experto en la técnica proporcionar dicho dominio extracelular de AXL recombinante.

En una realización, el anticuerpo tiene una tasa de disociación de $6,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para AXL, y en donde la tasa de disociación se mide por interferometría de Biocapa utilizando el dominio extracelular de AXL recombinante soluble.

La afinidad de unión se puede determinar como se ha descrito anteriormente (y en el Ejemplo 2). Por lo tanto, el anticuerpo puede tener una tasa de disociación de $6,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para AXL, y en donde la tasa de disociación se mide por medio de un método que comprende las etapas de

- i) cargar biosensores de captura Fc antihumanos con anticuerpos anti-AXL, y
- ii) determinar la asociación y disociación del dominio extracelular de AXL recombinante mediante

Interferometría de Biocapa a diferentes concentraciones.

El término "velocidad de disociación", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la velocidad a la que un anticuerpo específico de antígeno se une a su antígeno, se disocia de ese antígeno y se expresa como s^{-1} . Por lo tanto, en el contexto de un anticuerpo que se une a AXL, el término "velocidad de disociación" se refiere al anticuerpo que se une a AXL, se disocia del dominio recombinante extracelular de AXL y se expresa como s^{-1} .

AXL puede ser AXL humana. La secuencia de aminoácidos de AXL está de acuerdo con Swissprot P30530.

AXL puede ser AXL de mono cinomolgo (acceso de Genbank HB387229.1).

El anticuerpo puede tener al menos una región de unión que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada variable (VH) que tienen al menos 95%, tal como al menos 96%, tal como al menos 97%, tal como al menos 98%, tal como al menos el 99%, de identidad de secuencia con secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente **[107]**;
- b) SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente **[613]**;
- c) SEQ ID NO: 93, 126 y 127, respectivamente **[613/608-01/610-01/620-06]**;
- d) SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente **[608-01]**;
- e) SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente **[610-01]**;
- f) SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente, **[613-08]**; y
- g) SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente **[620-06]**.

El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada (VH) variable que tienen a lo sumo 5 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 4 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 3 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 2 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 1 mutación o sustitución, en total a lo largo de las secuencias CDR en dicha cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente **[107]**;
- b) SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente **[613]**;
- c) SEQ ID NO: 93, 126 y 127, respectivamente **[613/608-01/610-01/620-06]**;
- d) SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente **[608-01]**;
- e) SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente **[610-01]**;
- f) SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente, **[613-08]**; y
- g) SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente **[620-06]**.

Se pueden permitir mutaciones o sustituciones de hasta cinco mutaciones o sustituciones a lo largo de las tres secuencias CDR en la cadena pesada variable. Las mutaciones o sustituciones pueden ser de aminoácidos conservativos, físicos o funcionales, de modo que las mutaciones o sustituciones no cambien el epítipo o preferiblemente no modifiquen la afinidad de unión al epítipo más de 30%, tal como más de 20% o tal como más de 10%. Los aminoácidos conservativos, físicos o funcionales se seleccionan entre los 20 aminoácidos naturales, es decir, Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr y Val.

El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada variable (VH) que se seleccionan del grupo que consiste en;

- a) SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente **[107]**;
- b) SEQ ID NO.: 93, 94 y 95, respectivamente **[613]**;
- c) SEQ ID NO: 93, 126 y 127, respectivamente **[613/608-01/610-01/620-06]**;
- d) SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente **[608-01]**;
- e) SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente **[610-01]**;
- f) SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente, **[613-08]**; y
- g) SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente **[620-06]**.

En una realización, la al menos una región de unión comprende una región de cadena pesada variable (VH) y una región de cadena ligera variable (VL) que tiene a lo sumo 10 mutaciones o sustituciones, a lo sumo 5 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 4 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 3 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 2 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 1 mutación o sustitución, a lo largo de dichas secuencias de cadena pesada variable y de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en;

- a) una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 2 **[107]**;
- b) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;
- c) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO:22 **[608-01]**;
- d) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO:24 **[610-01]**;
- e) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO:28 **[613-08]**; y
- f) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO:30 **[620-06]**.

Se pueden permitir hasta 10 mutaciones o sustituciones a lo largo de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable. Las hasta 10 mutaciones o sustituciones se pueden distribuir a lo largo de toda la longitud de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de cada región de unión. Las mutaciones o sustituciones pueden ser de aminoácidos conservativos, físicos o funcionales de manera que las mutaciones o sustituciones no cambien el epítipo y preferiblemente no modifiquen la afinidad de unión al epítipo más del 30%, como más del 20% o más del 10%. Los aminoácidos conservativos, físicos o funcionales se pueden seleccionar entre los 20 aminoácidos naturales encontrados, es decir, Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr y Val.

En una realización, la al menos una región de unión comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en;

- a) una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 2 **[107]**;
- b) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;
- c) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO:22 **[608-01]**;
- d) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO:24 **[610-01]**;
- e) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO:28 **[613-08]**; y
- f) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO:30 **[620-06]**.

Se pueden permitir mutaciones o sustituciones de hasta 10 mutaciones o sustituciones a lo largo de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable. Las hasta 10 mutaciones o sustituciones se pueden distribuir a lo largo de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable. Las hasta 10 mutaciones o sustituciones se pueden distribuir a lo largo de la región de unión. Las mutaciones o sustituciones pueden ser de aminoácidos conservativos, físicos o funcionales de manera que las mutaciones o sustituciones no cambien el epítipo o modifiquen la unión al epítipo.

La presente descripción proporciona anticuerpos que se unen a un dominio extracelular de AXL sin competir o interferir en la unión de Gas6 a AXL. En particular, el anticuerpo se puede unir al dominio extracelular de tipo Ig1 sin competir o interferir en la unión de Gas6 a AXL. El anticuerpo se puede unir al dominio extracelular de tipo Ig1 y no mostrar más de 20% de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. En particular, el anticuerpo puede mostrar no más de 15% de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. El anticuerpo puede mostrar no más de 10% de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. El anticuerpo puede mostrar no más de 5% de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. El anticuerpo puede mostrar no más de 4% de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. El anticuerpo puede mostrar no más de 2% de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. El anticuerpo puede mostrar no más de 1% de reducción de la unión máxima de Gas6. El anticuerpo se puede unir al dominio extracelular de tipo Ig2 sin competir o interferir en la unión de Gas6 a AXL. El anticuerpo se puede unir al dominio extracelular de tipo Ig2 y mostrar no más de 20%, tal como no más de 15%, tal como no más de 10%, tal como no más de 5%, tal como no más de 4%, tal como no más de 2%, tal como no más de 1%, de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. En relación con estas divulgaciones, la capacidad de competir o reducir la unión a Gas6 se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 o el Ejemplo 12. En una realización, el anticuerpo se une al dominio extracelular de tipo Ig2 sin competir o interferir en la unión máxima de Gas6 a AXL.

Los métodos para determinar un epítipo al que se une un anticuerpo son bien conocidos en la técnica y, por lo

tanto, el experto en la técnica sabría cómo determinar dicho epítipo. Sin embargo, un ejemplo para determinar si un anticuerpo se une dentro de cualquier epítipo definido en la presente memoria sería por mutaciones puntuales del dominio extracelular de AXL. Se encuentra dentro del conocimiento del experto en la técnica introducir mutaciones puntuales en el dominio extracelular de AXL y probar la unión de anticuerpos a dominios extracelulares de AXL mutados puntuales. Cuando se hace referencia a las posiciones de aminoácidos dentro de la proteína AXL en el contexto de los epítipos, la numeración se ha determinado como se describe en el Ejemplo 7. Por lo tanto, la numeración de las posiciones de aminoácidos que definen el epítipo se realizó basándose en las secuencias presentadas en la Figura 6, es decir el primer aminoácido en la secuencia mostrada estaba numerado como posición '1', el segundo como posición '2', etc.

El anticuerpo se puede unir a un epítipo dentro del dominio de tipo Ig1 de AXL, el epítipo comprende o requiere los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de AXL humana. En una realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio de tipo Ig1 de AXL, el epítipo comprende o requiere uno o más aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de AXL humana. El epítipo puede comprender uno o más aminoácidos en la posición L121, G122, H123, Q124, T125, F126, V127, S128, Q129 o más aminoácidos en la posición T112, G113, Q114, Y115, Q116, C117, L118, V119, F120, L121, G122, H123, Q124.

En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

El término "isotipo" como se emplea en la presente memoria se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) o cualquiera de sus alotipos, tal como IgG1m(za) e IgG1m(f) que está codificado por genes de región constante de cadena pesada. Además, cada isotipo de cadena pesada se puede combinar con una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

En una realización, el isotipo es IgG1, opcionalmente alotipo IgG1m (f).

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completo, opcionalmente un anticuerpo IgG1, κ monoclonal completo.

El término "anticuerpo completo" cuando se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo parental o variante) que contiene todos los dominios constantes y variables de cadena pesada y ligera correspondientes a los que normalmente se encuentran en un anticuerpo de tipo salvaje de ese isotipo. Se puede producir un anticuerpo completo según la presente invención mediante un método que comprende las etapas de (i) clonar las secuencias CDR en un vector adecuado que comprende secuencias completas de cadena pesada y secuencias completas de cadena ligera, y (ii) expresar la secuencia pesada completa y secuencias de cadena ligera en sistemas de expresión adecuados. Está dentro del conocimiento de la persona experta producir un anticuerpo completo cuando se inicia a partir de secuencias CDR o secuencias de región variable completa. Por lo tanto, la persona experta sabría cómo generar un anticuerpo completo según la presente invención.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano.

El término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y marco derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana y un dominio constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanos de la presente descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones, inserciones o deleciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, incluya anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie no humana, por ejemplo, de ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

Como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo humano se "obtiene a partir de" una secuencia de la línea germinal concreta si el anticuerpo se obtiene a partir de un sistema que utiliza secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo inmunizando un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o seleccionando una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana, y en donde el anticuerpo humano seleccionado tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, o tal como al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, fuera de la CDR3 de cadena pesada, un anticuerpo humano derivado de una secuencia concreta de la línea germinal humana no mostrará más de 20 diferencias de aminoácidos, p. ej. no más de 10 diferencias de aminoácidos, tal como no más de 9, 8, 7, 6 o 5, por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

El anticuerpo según la presente invención puede comprender modificaciones de aminoácidos en las cadenas

pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina. En una realización concreta, los aminoácidos en la región Fc del anticuerpo se pueden modificar.

- 5 El término "región Fc" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una región que comprende, en la dirección desde el extremo N- a C-terminal del anticuerpo, al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3. Una región Fc del anticuerpo puede mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del anfitrión, incluidas varias células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y los componentes del sistema del complemento.
- 10 El término "región bisagra" como se emplea en la presente memoria se refiere a la región bisagra de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región bisagra de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 216-230 de acuerdo con la numeración Eu como se establece en Kabat [26]. Sin embargo, la región bisagra también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.
- 15 El término "región CH1" o "dominio CH1" como se emplea en la presente memoria se refiere a la región CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH1 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 118-215 de acuerdo con la numeración Eu como se establece en Kabat [26]. Sin embargo, la región CH1 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.
- 20 El término "región CH2" o "dominio CH2" como se emplea en la presente memoria se refiere a la región CH2 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 231-340 de acuerdo con la numeración Eu como se establece en Kabat [26]. Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.
- 25 El término "región CH3" o "dominio CH3" como se emplea en la presente memoria se refiere a la región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 341-447 de acuerdo con la numeración Eu como se establece en Kabat [26]. Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.
- 30 El anticuerpo puede ser un anticuerpo con función efectora deficiente, un anticuerpo IgG4 estabilizado o un anticuerpo monovalente.

En particular, la cadena pesada puede haber sido modificada de modo que se haya eliminado toda la región bisagra.

- 35 La secuencia del anticuerpo puede haber sido modificada de modo que no comprenda ningún sitio aceptor para la glicosilación ligada a N.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena sencilla.

- 40 La presente descripción se refiere adicionalmente a un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos una primera región de unión de un anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria, y una segunda región de unión que se une a una diana o epítipo diferentes de los de la primera región de unión. El término "anticuerpo multiespecífico" como se emplea en la presente memoria, se refiere a anticuerpos en los que las regiones de unión son de dos a al menos dos, tal como al menos tres, antígenos diferentes o al menos dos, como al menos tres, epítopos diferentes sobre el mismo antígeno.
- 45

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o realizaciones descritas en la presente memoria, y una segunda región de unión que se une a una diana o epítipo diferentes de los de la primera región de unión.

- 50 El término "biespecífico", como se emplea en la presente memoria, se refiere a moléculas de unión, tales como anticuerpos en los que las regiones de unión de la molécula de unión se unen a dos antígenos diferentes o dos epítopos diferentes sobre el mismo antígeno.
- 55 El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades para al menos dos epítopos diferentes, típicamente no solapantes. Tales epítopos pueden estar en la misma diana o en dianas diferentes. Si los epítopos están en dianas diferentes, tales dianas pueden estar en la misma célula o en diferentes células, tipos de células o estructuras, tales como el tejido extracelular.
- 60 El término "diana diferente" como se emplea en la presente memoria, se refiere a otra proteína, molécula o similar a AXL o a un fragmento de AXL.

Los ejemplos de moléculas de anticuerpos biespecíficos que se pueden utilizar en la presente invención comprenden (i) un solo anticuerpo que tiene dos brazos que comprenden diferentes regiones de unión a antígeno,

(ii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para dos epítopos diferentes, por ejemplo, a través de dos scFv conectados en tándem por un conector peptídico adicional; (iii) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig™), donde cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto [29]; (iv) un fragmento biespecífico (Fab')₂ conectado químicamente; (v) un Tandab®, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vi) un flexicuerpo "flexibody", que es una combinación de scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (vii) una denominada molécula de "acoplamiento y bloqueo" (Dock-and-Lock®), basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la Proteína Quinasa A, que, cuando se aplica a los Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste de dos fragmentos Fab idénticos conectados a un fragmento Fab diferente; (viii) una denominada molécula Scorpion, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un diacuerpo.

El anticuerpo biespecífico puede ser un diacuerpo, un anticuerpo biespecífico que combina dos o más elementos que reconocen antígenos "cross-body", tal como CrossMabs, o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio de brazo Fab controlado (como se describe en [30]).

Los ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a (i) moléculas de tipo IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; (ii) moléculas de direccionamiento dual de tipo IgG recombinantes, en donde los dos lados de la molécula contienen cada uno el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; (iii) moléculas de fusión de IgG, en donde los anticuerpos IgG completos se fusionan con un fragmento Fab adicional o partes del fragmento Fab; (iv) moléculas de fusión de Fc, en donde las moléculas Fv de cadena sencilla o los diacuerpos estabilizados se fusionan con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos; (v) moléculas de fusión de Fab, en donde diferentes fragmentos Fab se fusionan entre sí, se fusionan con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos; y (vi) anticuerpos ScFv y de cadena pesada y basados en diacuerpos (p. ej., anticuerpos de dominio, Nanobodies®) en los que se fusionan diferentes moléculas de Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos o anticuerpos de cadena pesada diferentes (p. ej., anticuerpos de dominio, Nanobodies®) a cada una de las demás u otra proteína o molécula portadora fusionada a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos.

Los ejemplos de moléculas de tipo IgG con dominios CH3 complementarios incluyen, entre otros, Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, [31]), los Botones en Ojales "Knobs-into-Holes" (Genentech, [32]), CrossMabs (Roche, [33]) y las emparejadas electrostáticamente (Amgen, [34] y [35]; Chugai, [36]; Oncomed, [37]), LUZ-Y (Genentech), DIG-body y PIG-body (Pharmabicine), anticuerpo de fusión de Dominio Modificado Genéticamente de Intercambio de Cadenas (SEEDbody) (EMD Serono, [38]), Biclomics (Merus), FcΔAdp (Regeneron, [39]), IgG1 e IgG2 biespecíficas (Pfizer/Rinat, [40]), plataforma Azymetric (Zymeworks/Merck, [41]), mAb-Fv (Xencor, [42]), anticuerpos biespecíficos bivalentes (Roche [43]) y moléculas DuoBody® (Genmab A/S, [30]).

Los ejemplos de moléculas de direccionamiento dual de tipo IgG recombinantes incluyen, pero no se limitan a, Ig de Direccionamiento Dual (DT) (GSK/Domantis), Anticuerpo Dos en uno (Genentech), Mab entrecruzados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, [44]), Zybodies™ (Zyngenia), enfoques con una cadena ligera común (Crucell/Merus, [45]), κABodies (NovImmune) y CovX-body (CovX/Pfizer).

Los ejemplos de moléculas de fusión de IgG incluyen, entre otros, Ig de dominio variable dual (DVD)-Ig™ (Abbott, [46]), anticuerpos de doble cabeza de dominio dual (Unilever; Sanofi Aventis, [47]), biespecífico de tipo IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, [48]), fusión de scFv (Novartis), fusión de scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, [49]) y TvAb (Roche, [50], [51]).

Los ejemplos de moléculas de fusión Fc incluyen, entre otros, Fusiones ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Tecnología de Redireccionamiento de Afinidad Dual (Fc-DART™) (MacroGenics, [52], [53]) y Dual(ScFv)₂-Fab (Centro Nacional de Investigación de Medicina de Anticuerpos - China).

Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos de fusión de Fab incluyen, entre otros, F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech).

Los ejemplos de anticuerpos ScFv, basados en diacuerpos y anticuerpos de dominio incluyen, pero no se limitan a, Acoplador biespecífico de células T (BiTE®) (Micromet, Diacuerpo en Tándem (Tandab™) (Affimed), Tecnología de Redireccionamiento Afinidad Dual (DART) (MacroGenics), Diacuerpo de Cadena Sencilla (Academic), Anticuerpos de tipo TCR (AIT, ReceptorLogics), Fusion ScFv de Albúmina de Suero Humano (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanobodies® de direccionamiento dual (Ablynx), anticuerpos de dominio único de cadena pesada de direccionamiento dual.

Se puede generar un anticuerpo biespecífico según la presente invención mediante la introducción de modificaciones en la región constante del anticuerpo.

5 A menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto, los aminoácidos de las secuencias de la región constante se numeran de acuerdo con el índice de numeración Eu (descrito en [26]). Los términos "índice de numeración Eu" y "numeración Eu según lo establecido en Kabat" se pueden utilizar indistintamente y tienen el mismo significado y propósito. Por lo tanto, un aminoácido o segmento en una secuencia que "corresponde a" un aminoácido o segmento en otra secuencia es uno que se alinea con el otro aminoácido o segmento utilizando un programa de alineamiento de secuencia convencional tal como ALIGN, ClustalW o similar, típicamente en configuración predeterminada y tiene al menos 50%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de identidad con una cadena pesada de IgG1 humana. Es bien conocido en la técnica cómo alinear una secuencia o segmento en una secuencia y así determinar la posición correspondiente en una secuencia a una posición de aminoácido según la presente invención.

15 El término "aminoácido correspondiente a las posiciones" como se emplea en la presente memoria se refiere a un número de posición de aminoácido en una cadena pesada de IgG1 humana.

20 La presente descripción también proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, la región VH o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de una VL, VH o CDR utilizada en el contexto de un anticuerpo contra AXL todavía permite que el anticuerpo retenga al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95 %, 99% o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo parental y, en algunos casos, dicho anticuerpo contra AXL puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo parental.

25 Tales variantes funcionales conservan típicamente una identidad de secuencia significativa con el anticuerpo parental. El porcentaje de identidad entre dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que se debe introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático, que es bien conocido en la técnica.

35 Las secuencias de VH, VL y/o CDR de las variantes pueden diferir de las de las secuencias de anticuerpos parentales a través de sustituciones principalmente conservativas; por ejemplo, al menos aproximadamente 35%, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 70% o más, aproximadamente 75% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 85% o más, aproximadamente 90% o más, (p. ej., aproximadamente 65-95%, tal como aproximadamente 92%, 93% o 94%) de las sustituciones en la variante son reemplazos conservativos de residuos de aminoácidos.

40 Las secuencias de VH, VL y/o CDR de las variantes pueden diferir de las de las secuencias de anticuerpos parentales a través de sustituciones principalmente conservativas; por ejemplo 10 o menos, tal como 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos o 1 de las sustituciones en la variante son reemplazos conservativos de residuos de aminoácidos.

45 Los términos "aminoácido" y "residuo de aminoácido" se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria, y no se debe entender que sean limitantes.

50 En el contexto de la presente invención, el aminoácido se puede definirse mediante aminoácidos conservativos o no conservativos y, por lo tanto, se puede clasificar en consecuencia. Los residuos de aminoácidos también se pueden dividir en clases definidas por las propiedades físicas y funcionales alternativas. Por lo tanto, las clases de aminoácidos se pueden reflejar en una o ambas de las siguientes tablas:

Residuo de aminoácido de clase conservativa

Residuos Ácidos	D y E
Residuos Alcalinos	K, R y H
Residuos Hidrófilos Sin Carga	S, T, N y Q
Residuos Alifáticos Sin Carga	G, A, V, L e I
Residuos No Polares Sin Carga	C, M y P
Residuos Aromáticos	F, Y y W

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de residuos de aminoácidos

Residuos que contienen grupos de alcohol.	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V y M
Residuos asociados a cicloalqueno	F, H, W e Y
Residuos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Residuos con carga negativa	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Residuos cargados positivamente	H, K y R
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Residuos muy pequeños	A, G y S
Residuos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

En el contexto de la presente invención, una sustitución en un anticuerpo se indica como:

5 Aminoácido original - posición - aminoácido sustituido;

En referencia a la nomenclatura bien reconocida para aminoácidos, se utiliza el código de tres letras o el código de una letra, incluidos los códigos "Xaa" o "X" para indicar cualquier residuo de aminoácido. Por lo tanto, Xaa o X pueden representar típicamente cualquiera de los 20 aminoácidos de origen natural. El término "de origen natural" como se emplea en la presente memoria se refiere a uno cualquiera de los siguientes residuos de aminoácidos; glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico, glutamina, prolina, triptófano, fenilalanina, tirosina, metionina y cisteína. Por consiguiente, la notación "K409R" o "Lys409Arg" significa que el anticuerpo comprende una sustitución de lisina por arginina en la posición de aminoácido 409.

La sustitución de un aminoácido en una posición dada por cualquier otro aminoácido se denomina: Aminoácido original - posición; o p. ej. "K409"

Para una modificación en la que los aminoácidos originales y/o los aminoácidos sustituidos pueden comprender más de uno, pero no todos los aminoácidos, el más de un aminoácido puede estar separado por "," o "/". p. ej. la sustitución de lisina por arginina, alanina o fenilalanina en la posición 409 es: "Lys409Arg,Ala,Phe" o "Lys409Arg/Ala/Phe" o "K409R,A,F" o "K409R/A/F" o "K409 a R, A o F".

Tal designación se puede utilizar indistintamente en el contexto de la invención, pero tiene el mismo significado y propósito.

Además, el término "una sustitución" abarca una sustitución en uno cualquiera o los demás diecinueve aminoácidos naturales, o en otros aminoácidos, tales como aminoácidos no naturales. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido K en la posición 409 incluye cada una de las siguientes sustituciones: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V, 409W, 409P y 409Y. Esto es, por cierto, equivalente a la designación 409X, en donde la X designa cualquier aminoácido que no sea el aminoácido original. Estas sustituciones también se pueden designar K409A, K409C, etc. o K409A,C, etc. o K409A/C/etc. Lo mismo se aplica por analogía a todas y cada una de las posiciones mencionadas en la presente memoria, para incluir específicamente en la presente memoria cualquiera de tales sustituciones.

El anticuerpo según la invención también puede comprender una delección de un residuo de aminoácido. Tal delección puede denotarse "del" e incluye, p. ej., la forma K409del. Por lo tanto, en tales realizaciones, la Lisina en la posición 409 se ha suprimido de la secuencia de aminoácidos.

En una realización concreta, el anticuerpo biespecífico comprende una primera y una segunda cadena pesada, cada una de la primera y segunda cadena pesada comprende al menos una región bisagra, una región CH2 y CH3, en donde en la primera cadena pesada se ha sustituido al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 en una cadena pesada de IgG1 humana, y en la segunda cadena pesada, se ha sustituido al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana, y en la que la primera y la segunda

cadenas pesadas no están sustituidas en las mismas posiciones.

La presente descripción proporciona anticuerpos, en donde en la primera cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana no es K, L o M y opcionalmente el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es F, y en la segunda cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es K.

La presente descripción proporciona anticuerpos, en donde en la primera cadena pesada, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F, R y G, y en la segunda cadena pesada los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en; T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana han sido sustituidos.

La presente descripción proporciona anticuerpos, en donde el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es diferente de K, L o M en la primera cadena pesada, y en la segunda cadena pesada el aminoácido en posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F y opcionalmente el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es K.

El aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana puede ser L en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana puede ser R en dicha segunda cadena pesada, o viceversa.

Así, en una realización, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la segunda cadena pesada.

La presente descripción proporciona anticuerpos, en los que tanto la primera como la segunda región de unión del anticuerpo biespecífico se unen a AXL. Sin embargo, la primera región de unión comprende un conjunto diferente de secuencias CDR que la segunda región de unión. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico puede comprender una primera y una segunda región de unión, y una primera y una segunda cadena pesada, en donde la primera y la segunda regiones de unión comprenden cada una una región VH y VL seleccionada del grupo que consiste en;

a) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**;

b) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente, y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente **[733]**;

c) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 44, AAS y 45, respectivamente, **[140]**;

d) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 51, 52 y 55, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente. **[154]**;

e) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente. **[154-M103L]**;

f) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente, **[171]**;

g) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID

- respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 86, GAS y 87, respectivamente, **[608-01]**;
- 5 u) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 91, GAS y 92, respectivamente, **[610-01]**;
- 10 v) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 94, 95 y 95, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;
- 15 w) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 101, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**;
- 20 x) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 106, GAS y 107, respectivamente, **[620-06]**;
- 25 y) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 86, GAS y 87, respectivamente, **[608-01]**;
- 30 z) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 91, GAS y 92, respectivamente, **[610-01]**;
- 35 aa) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 94, 95 y 95, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;
- 40 bb) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 101, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**; y
- 45 cc) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 106, GAS y 107, respectivamente, **[620-06]**.

Producto conjugado de anticuerpo anti-AXL y fármaco – productos inmunoconjugados

- 55 Los anticuerpos de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención se pueden conjugar con un radical terapéutico o de diagnóstico, tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico, una citocina, un inmunosupresor, antibiótico o un radioisótopo. Tales productos conjugados se denominan en la presente memoria "productos inmunoconjugados". Los productos inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Los anticuerpos conjugados con un agente citotóxico, fármaco o similar también se conocen como
- 60 productos conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Un producto inmunoconjugado puede tener una semivida de períodos de tiempo suficientes para que el conjugado de anticuerpo-fármaco sea internalizado, degradado e induzca la muerte celular por la toxina liberada.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto inmunoconjugado que comprende el

anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o realización descrito en la presente memoria, o un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquier aspecto o realización descrito en la presente memoria, y un radical terapéutico, tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico, una citocina, un inmunosupresor, antibiótico o un radioisótopo. El agente citotóxico, el fármaco quimioterapéutico, la citocina, el inmunosupresor, el antibiótico o el radioisótopo se pueden conjugar con el anticuerpo o el anticuerpo biespecífico a través de un conector.

Los ADC a menudo están diseñados de tal manera que la carga útil citotóxica está inactiva cuando se conjuga con el anticuerpo. La carga útil citotóxica se puede liberar intracelularmente tras la internalización del ADC después de unirse a la membrana plasmática de las células, o alternativamente en respuesta a la actividad proteolítica en el microentorno tumoral. El término "internalizado" o "internalización", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un proceso biológico en el que las moléculas tales como el anticuerpo según la presente invención, son absorbidas por la membrana celular y arrastradas al interior de la célula. Esto también se puede denominar "endocitosis".

Por lo tanto, los anticuerpos de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención pueden internalizarse en la célula al unirse a la diana, AXL.

En algunos casos, se puede desear utilizar anticuerpos que experimenten internalización. Tales anticuerpos que tienen buenas propiedades de internalización pueden ser adecuados para la conjugación con un agente citotóxico, fármaco o similar, opcionalmente a través de un conector, que está diseñado para escindirse intracelularmente.

Una vez internalizado, el ADC se puede administrar a los lisosomas en la mayoría de los casos, donde la liberación eficaz del fármaco aprovecha el entorno catabólico que se encuentra con estos orgánulos. Normalmente es un conector que conecta el anticuerpo con un agente citotóxico. Por lo tanto, los conectores especializados se han diseñado para escindirse solo en un microentorno específico que se encuentra en la célula tumoral la diana o en el microentorno tumoral. Los ejemplos incluyen conectores que son escindidos por condiciones ácidas, condiciones reductoras o proteasas específicas.

La estabilidad del anticuerpo-conector-fármaco en circulación es importante debido a que permite el suministro del fármaco mediado por anticuerpos a células diana específicas. Además, la larga semivida en circulación del ADC proporciona exposición durante varios días o semanas después de la inyección. Los fármacos que se conjugan a través de conectores no escindibles y enlaces proteicos escindibles por proteasas son generalmente más estables en circulación que los enlaces disulfuro e hidrazona, aunque la estabilidad de los últimos dos enlaces puede ajustarse alterando la estructura química vecina [6].

El radical terapéutico puede ser un agente citotóxico.

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (p. ej., destruir) las células. Los agentes citotóxicos adecuados para formar productos inmunoconjugados de la presente invención incluyen taxol, tubulisinas, duostatina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiانترacínodiona, maitansina, o un análogo o derivado del mismo, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina; caliqueamicina o análogos o derivados de la misma; antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, descarcarina, hidroxiaurea, asparraginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino; así como duocarmicina A, duocarmicina SA, CC-1065 (a.k.a. raquelmicina), o análogos o derivados de CC-1065), dolastatina, auristatina, pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas (PDB), indolinobenzodiazepinas (IGN) o análogos de los mismos, antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), agentes antimetabólicos (p. ej., agentes dirigidos a la tubulina), tales como la toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como la cadena A de la difteria y sus fragmentos activos y moléculas híbridas); toxina ricina (tal como la ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglucosilada), toxina del cólera, una toxina similar a Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen péptidos antimicrobianos/lífticos tales como CLIP, Magainina 2, melitina, Cecropina y P18; ribonucleasa (ARNasa), ADNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, toxina diftérica y endotoxina de *Pseudomonas*. Véanse, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) y Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Los

agentes terapéuticos que se pueden administrar combinados con anticuerpos anti-AXL o productos conjugados de anticuerpo-fármaco de la presente invención como se describe en otra parte en la presente memoria, tales como, por ejemplo, citocinas o quimiocinas anticancerosas, también son candidatos para radicales terapéuticos útiles para la conjugación con un anticuerpo descrito en la presente invención.

El término "agente citotóxico" como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier agente que sea perjudicial para (p. ej., destruir) las células. Para una descripción de estas clases de fármacos que son bien conocidos en la técnica, y sus mecanismos de acción, véase [54]. Las técnicas adicionales relevantes para la preparación de inmunotoxinas con anticuerpos se proporcionan, por ejemplo, en [55] y [56].

El agente citotóxico puede estar conectado a dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, con un conector escindible, tal como 4-(2-piridilditio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (SSP), maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobenciloxicarbonilo (mc-vc-PAB) o AV-1 K-lock valina-citrulina.

El término "conector escindible" como se emplea en la presente memoria, se refiere a un subconjunto de conectores que son catalizados por proteasas específicas en la célula diana o en el microentorno tumoral, dando como resultado la liberación del agente citotóxico. Los ejemplos de conectores escindibles son conectores basados en motivos químicos que incluyen disulfuros, hidrazonas o péptidos. Otro subconjunto de conector escindible añade un motivo conector adicional entre el agente citotóxico y el conector primario, es decir, el sitio que une la combinación conector-fármaco al anticuerpo. El motivo del conector adicional puede ser escindido por un agente escindible que está presente en el entorno intracelular (p. ej., dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El conector puede ser, p. ej. un conector peptídico que es escindido por una peptidasa intracelular o enzima proteasa, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el conector peptídico tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todos los cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipeptídicos que dan como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, p. ej., Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). El conector peptídico puede ser escindido por una proteasa intracelular es un conector Val-Cit (valina-citrulina) o un conector Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase p. ej. el documento US6214345, que describe la síntesis de doxorubicina con el conector Val-Cit). Una ventaja de utilizar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa típicamente cuando se conjuga y las estabilidades en suero de los productos conjugados son típicamente altas.

En otra realización, el agente citotóxico está unido a dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, con un conector no escindible, tal como 4(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (MCC) o maleimidocaproilo (MC).

El término "conector no escindible" como se emplea en la presente memoria, se refiere a un subconjunto de conectores que, a diferencia de los conectores escindibles, no comprenden motivos que son reconocidos específica y predeciblemente por proteasas intracelulares o extracelulares. Por lo tanto, los ADC basados en conectores no escindibles no se liberan o escinden del anticuerpo hasta que el complejo completo de anticuerpo-conector-fármaco se degrada en el compartimento lisosómico. Los ejemplos de un conector no escindible son los tioéteres. En otra realización más, la unidad conectora no es escindible y el fármaco se libera por degradación de anticuerpos (véase [57]). Típicamente, dicho conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se emplea en la presente memoria, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular" en el contexto de un conector significa que no más de 20%, típicamente no más de aproximadamente 15%, más típicamente no más de aproximadamente 10%, e incluso más típicamente no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 3%, o no más de aproximadamente 1% de los conectores, en una muestra de compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco, se escinden cuando el compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco está presente en un entorno extracelular (p. ej., plasma). Se puede determinar si un conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, por ejemplo, incubando con plasma el compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco durante un período de tiempo predeterminado (p. ej., 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y a continuación cuantificando la cantidad de fármaco presente en el plasma.

En una realización, el agente citotóxico se selecciona del grupo: agentes que se dirigen al ADN, p. ej. alquilantes de ADN y entrecruzadores, tales como caliqueamicina, duocarmicina, raquelmicina (CC-1065), pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas (PBD) e indolinobenzodiazepina (IGN); agentes dirigidos a los microtúbulos, tales como duostatina, como duostatina-3, auristatina, tal como monometilauristatina E (MMAE) y monometilauristatina F (MMAF), dolastatina, maitansina, *N*(2')-deacetil-*N*(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1), y tubulisina; y análogos de nucleósidos; o análogos, derivados o profármacos de los mismos.

En una realización, el producto immunoconjugado comprende una combinación de;

- i) el agente citotóxico y dicho conector escindible que tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad (bystander);
- ii) el agente citotóxico y dicho conector escindible que no tiene capacidad de destrucción por efecto de

vecindad;

iii) el agente citotóxico y dicho conector no escindible que tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad; o

iv) el agente citotóxico y dicho conector no escindible que no tiene capacidad destrucción por efecto de vecindad.

El término "efecto de destrucción por vecindad", "destrucción por efecto de vecindad", "capacidad destrucción por efecto de vecindad" o "citotoxicidad por efecto de vecindad" como se emplea en la presente memoria, se refiere al efecto donde el agente citotóxico que se conjuga con el anticuerpo mediante un conector escindible o no escindible tiene la capacidad de difundirse a través de las membranas celulares después de la liberación del anticuerpo y, por lo tanto, causar la destrucción de las células vecinas. Cuando el agente citotóxico se conjuga con un conector escindible o no escindible, este puede ser el agente citotóxico solo o el agente citotóxico con una parte del conector que tiene la capacidad de destrucción por efecto de vecindad. La capacidad de difundirse a través de las membranas celulares está relacionada con el carácter hidrófobo del agente citotóxico o la combinación del agente citotóxico y el conector. Tales agentes citotóxicos pueden ser ventajosamente toxinas permeables a la membrana, tales como MMAE que ha sido liberada del anticuerpo por las proteasas. Especialmente en tumores con expresión de dianas heterogéneas y en tumores sólidos donde la penetración de anticuerpos puede ser limitada, puede ser deseable un efecto de destrucción por efecto de vecindad.

El término "sin capacidad de destrucción por efecto de vecindad", "sin efecto de destrucción por efecto de vecindad", "sin destrucción por efecto de vecindad" o "sin citotoxicidad por efecto de vecindad" como se emplea en la presente memoria, se refiere al efecto en el que el agente citotóxico que se conjuga con el anticuerpo mediante un agente escindible o el conector no escindible no tiene la capacidad de difundirse a través de las membranas celulares después de la liberación del anticuerpo. Por lo tanto, tales agentes citotóxicos o combinaciones del agente citotóxico con el conector no podrán destruir las células vecinas tras la liberación del anticuerpo. Se cree, sin estar limitados por la teoría, que tales combinaciones de un agente citotóxico y un conector escindible o no escindible solo destruirán las células que expresan la diana a la que se une el anticuerpo.

Una conexión estable entre el anticuerpo y el agente citotóxico es un factor importante de un ADC. Se ha comprobado que tanto los tipos de conectores escindibles como los no escindibles son seguros en ensayos preclínicos y clínicos.

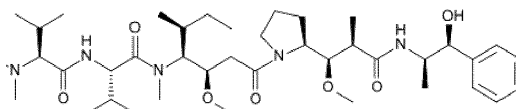
En una realización, el agente citotóxico se elige del grupo de agentes dirigidos a microtúbulos, tales como auristatinas y maitansinoides.

El término "agente dirigido a microtúbulos" como se emplea en la presente memoria, se refiere a un agente o fármaco que inhibe la mitosis (división celular). Los microtúbulos son estructuras que son esenciales para la separación adecuada del ADN durante la división celular, y la función de los microtúbulos depende fundamentalmente de la 'inestabilidad dinámica', es decir, el proceso en el que las estructuras de los microtúbulos se alargan y acortan continuamente. Los agentes dirigidos a los microtúbulos interrumpen o estabilizan los microtúbulos, lo que impide la formación del huso mitótico, lo que da como resultado la parada mitótica y la apoptosis. Los agentes dirigidos a los microtúbulos se pueden obtener a partir de, p. ej. sustancias naturales tales como los alcaloides de las plantas y evitan que las células experimenten mitosis al interrumpir o estabilizar la polimerización de los microtúbulos, evitando así la formación del huso mitótico y la posterior división celular, lo que da como resultado la inhibición del crecimiento canceroso. Ejemplos de agentes dirigidos a los microtúbulos son paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, duostatina, auristatinas, maitansinoides, tubulinas y dolastatina.

El agente citotóxico puede ser auristatina o análogos y derivados del péptido auristatina ([131]; [132]). Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular [133] y tienen actividad anticancerosa [134] y antifúngica [135]. El radical del fármaco auristatina se puede anclar al anticuerpo a través de un conector, a través del extremo N terminal (amino) o del extremo C terminal (carboxilo) del radical del fármaco peptídico.

Las realizaciones ilustrativas de auristatina incluyen los radicales de fármaco monometil auristatina conectados al extremo N terminal, DE y DF, descritos en [136] y descritos en [137].

El agente citotóxico puede ser monometil auristatina E (MMAE);

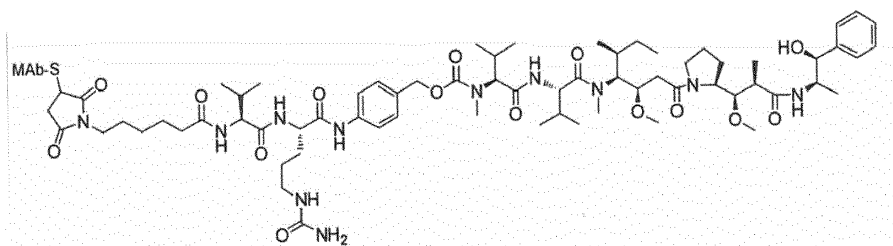


en donde el anticuerpo está unido a MMAE en el nitrógeno (N) en el lado izquierdo de la estructura química anterior mediante el conector apropiado.

5 El agente citotóxico monometil auristatina E (MMAE) se puede conectar al anticuerpo a través de un conector de valina-citrulina (VC).

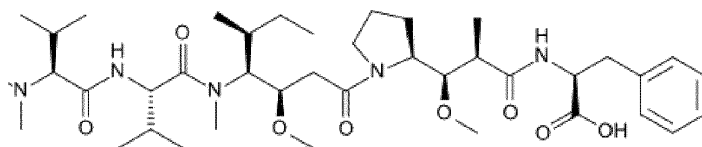
El agente citotóxico monometil auristatina E (MMAE) se puede conectar al anticuerpo a través de un conector de valina-citrulina (VC) y el conector de maleimidocaproilo (MC), en donde la combinación del agente citotóxico y los conectores tiene la estructura química;

10



en donde MAb es el anticuerpo.

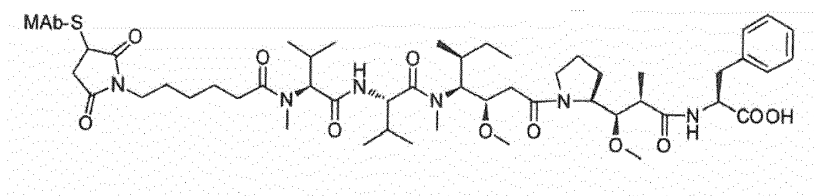
15 El agente citotóxico puede ser monometil auristatina F (MMAF);



20 en donde el anticuerpo está conectado a MMAF en el nitrógeno (N) en el lado izquierdo de la estructura química anterior mediante el conector apropiado.

El agente citotóxico de monometil auristatina F (MMAF) se puede conectar al anticuerpo a través de un conector de maleimidocaproilo (mc), en donde la combinación del agente citotóxico y el conector tiene la estructura química;

25



en donde MAb es el anticuerpo.

El agente citotóxico puede ser duostatina3.

30

El agente citotóxico puede ser un agente dirigido al ADN.

El término "agente que actúa sobre el ADN" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una clase específica de agentes citotóxicos que son capaces de alquilar y/o entrecruzar ADN. Un ejemplo de tal agente que actúa sobre el ADN son los agentes IGN que comprenden dímeros indolino-benzodiazepina y pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas (PBD) que son altamente potentes en virtud de su capacidad para alquilar y entrecruzar ADN. Otro ejemplo son los agentes IGN que comprenden monómeros de indolino-benzodiazepina que son altamente potentes en virtud de la capacidad de alquilar solo ADN. Las duocarmicinas son otra clase de agentes que actúan sobre el ADN. Las duocarmicinas son agentes alquilantes que se unen a los surcos menores de ADN sintético de molécula pequeña. Estos compuestos son adecuados para atacar tumores sólidos, así como tumores hematológicos.

El producto inmunoconjugado puede comprender de dos a cuatro moléculas citotóxicas por anticuerpo. Dependiendo de las propiedades químicas de la toxina y la combinación del conector-toxina, de dos a cuatro moléculas citotóxicas por anticuerpo pueden ser superiores a los productos conjugados más cargados que se eliminan más rápidamente de la circulación que los productos conjugados menos cargados. La carga del agente

45

citotóxico está representada por p y es el número promedio de radicales de agente citotóxico por anticuerpo en una molécula (también denominada razón de fármaco/anticuerpo, DAR). La carga del agente citotóxico puede variar de 1 a 20 radicales de fármaco por anticuerpo y puede aparecer en aminoácidos con grupos funcionales útiles tales como, pero sin limitación, grupos amino o sulfhidrilo, como en la lisina o la cisteína.

5 El número de agentes citotóxicos por anticuerpo puede ser de 1 a 8, tal como de 2 a 7, tal como de 2 a 6, tal como de 2 a 5, tal como de 2 a 4 y tal como de 2 a 3.

10 El producto inmunoconjugado puede comprender de cuatro a ocho moléculas citotóxicas por anticuerpo. El producto inmunoconjugado puede comprender de seis a diez moléculas citotóxicas por anticuerpo. Alternativamente, el producto inmunoconjugado puede comprender de 10 a 30, tal como de 15 a 25, tal como 20, moléculas citotóxicas por anticuerpo.

15 Dependiendo de la forma de conjugación, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo, por ejemplo, donde el anclaje es un tiol de cisteína o una lisina. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres ni reactivos que puedan estar anclados a un radical de fármaco ya que la mayoría de los residuos tiol de cisteína en los anticuerpos existen como puentes disulfuro. Por lo tanto, en esas realizaciones, donde el agente citotóxico se conjuga a través de un tiol de cisteína, el anticuerpo se puede reducir con un agente reductor como ditioneitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones de reducción parcial o total, para
20 generar grupos reactivos tiol de cisteína. En ciertas realizaciones, la carga del fármaco para un ADC de la invención varía de 1 a aproximadamente 8, ya que está disponible un máximo de 8 grupos tiol de cisteína libres después de la reducción (parcial) del anticuerpo (hay 8 cisteínas implicadas en los enlaces disulfuro intercatenarios).

25 El radical conector de fármaco puede ser vcMMAE. El radical conector de fármaco vcMMAE y los métodos de conjugación se describen en [27]; [28]; [145], [146]; y [147] vcMMAE se forma mediante la conjugación del conector mc-vc-PAB y el radical citotóxico MMAE, y el radical conector del fármaco vcMMAE se une a los anticuerpos anti-AXL en los residuos de cisteína utilizando un método similar a los allí descritos.

30 El radical conector de fármaco puede ser mcMMAF. El radical conector de fármacos mcMMAF y los métodos de conjugación se describen en [138]; [139] y [140], y el radical conector del fármaco mcMMAF se une a los anticuerpos anti-AXL en los residuos de cisteína utilizando un método similar a los allí descritos.

35 El agente citotóxico se puede conectar a 1 o 2 lisinas dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mediante la conjugación K-Lock™ como se describe en [58], [148] y [149], y la duostatina3 (también conocida como Duo3) se puede unir a los anticuerpos anti-AXL en los residuos de lisina utilizando un método similar a los allí descritos.

40 Se pueden utilizar otras tecnologías de conectores en los productos conjugados de anticuerpo anti-AXL y fármaco de la invención, tales como conectores que comprenden un grupo hidroxilo.

45 El conector se puede anclar a residuos de cisteína libres del anticuerpo anti-AXL obtenido por reducción (parcial) del anticuerpo anti-AXL.

El conector puede ser mc-vc-PAB y el agente citotóxico puede ser MMAE; o el conector SSP y el agente citotóxico puede ser DM1.

El conector puede ser MMC y el agente citotóxico puede ser DM1; o el conector puede ser MC y el agente citotóxico puede ser MMAF.

50 El conector puede ser el conector escindible AV1-K lock y el agente citotóxico es duostatina3. El producto inmunoconjugado puede comprender el conector mc-vc-PAB, el agente citotóxico MMAE y un anticuerpo en donde la al menos una región de unión comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en;

- 55 a) una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 2 **[107]**;
- b) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;
- c) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO:22 **[608-01]**;
- d) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO:24 **[610-01]**;
- e) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO:28 **[613-08]**; y
- 60 f) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO:30 **[620-06]**.

Un producto conjugado de fármaco de anticuerpo anti-AXL de la presente descripción puede comprender un ácido nucleico conjugado o una molécula asociada a ácido nucleico. El ácido nucleico conjugado puede ser una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula inhibidora de ARN (p. ej., una molécula de ARNip) o un ácido nucleico inmunoestimulador (p. ej., una molécula de ADN inmunoestimuladora que contiene un

motivo CpG).

Un anticuerpo anti-AXL de la presente descripción se puede conjugar con un aptámero o una ribozima o un análogo peptídico funcional o derivado del mismo.

Alternativamente, se proporcionan productos conjugados de anticuerpo anti-AXL y fármaco que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Se puede utilizar un anticuerpo anti-AXL radiomarcado tanto para fines de diagnóstico como terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Los ejemplos no limitantes de marcadores para polipéptidos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc y ^{125}I , ^{131}I , y ^{186}Re . Los métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados de péptidos relacionados son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, [59] y [60], [61], [62], [63], [64] y [65]US 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse mediante un método de cloramina T.

El anticuerpo se puede conjugar con un radioisótopo o con un quelato que contiene radioisótopos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con un conector quelante, p. ej. DOTA, DTPA o tiuxetán, que permite que el anticuerpo forme un complejo con un radioisótopo. El anticuerpo también puede comprender o estar conjugado alternativamente con uno o más aminoácidos radiomarcados u otras moléculas radiomarcadas. Se puede utilizar un anticuerpo anti-AXL radiomarcado con fines tanto diagnósticos como terapéuticos. Los ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bs , ^{225}Ac y ^{227}Th .

Los anticuerpos anti-AXL también se pueden modificar químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida en circulación. Los polímeros ilustrativos y los métodos para anclarlos a péptidos se ilustran, por ejemplo, en [66]; [67]; [68]; y [69]. Los polímeros adicionales incluyen polioles polioxiethylados y polietilenglicol (PEG) (p. ej., un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000). Esto se puede utilizar, por ejemplo, si el anticuerpo anti-AXL es un fragmento.

Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo anti-AXL según la presente invención con la molécula o las moléculas conjugadas, tales como las descritas anteriormente, incluidos los métodos descritos mediante [70], [71] y [72]. Tales anticuerpos se pueden producir conjugando químicamente el otro radical con el lado N-terminal o el lado C-terminal del anticuerpo anti-AXL (p. ej., una cadena H o L de anticuerpo anti-AXL) (véase, por ejemplo, [73]). Tales derivados de anticuerpos conjugados también se pueden generar mediante conjugación en residuos internos o azúcares, o aminoácidos de origen no natural o aminoácidos adicionales que se han introducido en el dominio constante del anticuerpo, cuando sea apropiado.

Los agentes pueden ser acoplados directa o indirectamente a un anticuerpo anti-AXL descrito en la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento a través de un radical espaciador a residuos de cisteína o lisina en el anticuerpo. En una realización, un anticuerpo anti-AXL se conjuga, a través de un espaciador o conector, con una molécula de profármaco que se puede activar *in vivo* para proporcionar un fármaco terapéutico. Después de la administración, los espaciadores o conectores se escinden mediante enzimas asociadas a células tumorales u otras afecciones específicas del tumor, mediante las cuales se forma el fármaco activo. En [74], [75], [76], [77], [78] y [79] se describen ejemplos de tales tecnologías y conectores de profármacos. La tecnología adecuada de anticuerpo-pro-fármaco y los análogos de duocarmicina también se pueden encontrar en [80].

El anticuerpo anti-AXL de la presente invención se puede unir a un conector quelante, p. ej. tiuxetán, que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.

Composiciones

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo, el anticuerpo biespecífico o el producto inmunoconjugado de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, biespecífico o producto inmunoconjugado de acuerdo con la invención y un portador farmacéutico.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro coadyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en [81].

Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro coadyuvante y excipiente conocido, deberían ser adecuados para el anticuerpo o el producto conjugado de anticuerpo de la presente invención y el modo de administración elegido. La idoneidad para los portadores y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en base a la falta de impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto elegido o composición farmacéutica de la presente invención (p. ej., un impacto

menor que sustancial (10% o menos de inhibición relativa, 5% o menos de inhibición relativa, etc.) tras la unión al antígeno).

5 Una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (p. ej., azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

10 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración concretos, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones concretas de la presente invención empleadas, o la amida de las mismas, 15 la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto concreto empleado, la duración del tratamiento, otros medicamentos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

20 La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía y modo adecuados. Las vías adecuadas para administrar un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica.

La composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral.

25 Los términos "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se emplean en la presente memoria se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intra-orbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, 30 subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

35 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción, y similares adecuados que son fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

40 Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos 45 inyectables, tales como oleato de etilo y/o diversos tampones. Otros portadores son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.

50 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

55 La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más coadyuvantes apropiados para la ruta de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Tales portadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poli-orto-ésteres y ácido poliláctico solo o con cera u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, [82].

Los compuestos de la presente invención se pueden formular para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Los portadores farmacéuticamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También se pueden incorporar a las composiciones otros compuestos activos o terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas para inyección deben ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión acuoso o no acuoso que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, p. ej. como se enumeró anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración por esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos, p. ej. de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de los métodos de preparación son secado al vacío y secado mediante congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente en condiciones estériles del mismo.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración por esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de los métodos de preparación son secado al vacío y secado mediante congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente en condiciones estériles del mismo.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un anticuerpo, anticuerpo biespecífico o ADC de la presente invención, una combinación de un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico o ADC de acuerdo con la invención con otro compuesto terapéutico, o una combinación de compuestos de la presente invención.

Construcciones de ácido nucleico, vectores de expresión y células anfitrionas.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una construcción de ácido nucleico que codifica un anticuerpo según la invención. Por lo tanto, la presente descripción se refiere a construcciones de ácido nucleico que codifican una cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1, 2, 21 a 30, 36 a 40, 83 a 107, 119 a 129. La construcción de ácido nucleico puede codificar al menos una de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 36, 37, 38, 39, 40, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 y 129. La construcción de ácido nucleico puede codificar un anticuerpo de acuerdo con cualquier

aspecto o realización descritos en la presente memoria.

La presente descripción proporciona un vector de expresión que codifica un anticuerpo de la invención. Por lo tanto, en un aspecto de la invención, el vector de expresión comprende una o más construcciones de ácido nucleico de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria. Tales vectores de expresión se pueden utilizar para expresar el anticuerpo anti-AXL de la presente invención. El anticuerpo anti-AXL expresado se puede conjugar posteriormente con un radical como se describe en la presente memoria. En otra realización, el anticuerpo anti-AXL se puede utilizar posteriormente para generar un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente memoria.

El vector de expresión puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de VH seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 36-38, 83-85, 88-90, 93 -95, 98-100 y 103-105.

El vector de expresión puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de VH seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 21, 23, 25, 27 y 29.

El vector de expresión puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de VL seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, 22, 24, 26, 28 y 30.

El vector de expresión puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica variantes de una o más de las secuencias de aminoácidos anteriores, teniendo dichas variantes a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones de aminoácidos, tales como deleciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas o no conservativas, o al menos 80% de identidad con cualquiera de dichas secuencias, tal como al menos 85% de identidad o 90% de identidad o 95% de identidad, tal como 96% de identidad o 97% de identidad o 98% de identidad o 99% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente. La presente descripción también se refiere a secuencias de ácido nucleico diferentes de las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente pero que debido a la variación del código genético codifican la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede variar, pero da como resultado una secuencia de aminoácidos idéntica a cualquier secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria. Es bien sabido por el experto en la técnica cómo identificar tales secuencias adicionales de ácido nucleico basándose en el código genético.

El vector de expresión puede comprender adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o tanto la cadena ligera como la cadena pesada de un anticuerpo, p. ej. un anticuerpo monoclonal κ IgG1 humano.

Tales vectores de expresión como se ha descrito anteriormente se pueden utilizar para la producción recombinante de anticuerpos de la invención.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluidos los vectores de ácido nucleico cromosómico, no cromosómico y sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de expresión). Los ejemplos de tales vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-AXL está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe, por ejemplo, en [83]), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en [84] y/o [85]), un vector plasmídico como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "midge" (como se describe, por ejemplo, en [86]), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con CaPO₄ (como se describe, por ejemplo, en [87], [88], [89] y [90]). Tales vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, [91] y [92]).

El vector puede ser uno, que es adecuado para la expresión del anticuerpo anti-AXL en una célula bacteriana. Los ejemplos de tales vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN ([93], vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares).

Un vector de expresión puede ser también, o alternativamente, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: [94] y [95]).

Una construcción y/o vector de ácido nucleico también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que

codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigirse a un polipéptido, tal como una cadena de polipéptido nascente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Tales secuencias son conocidas en la técnica e incluyen péptidos señal o líder de secreción, secuencias dirigidas a orgánulos (p. ej., secuencias de localización nuclear, señales de retención ER, secuencias de tránsito mitocondriales, secuencias de tránsito de cloroplastos), secuencias de localización/anclaje de membrana (p. ej., secuencias de transferencia de parada, secuencias de anclaje de GPI) y similares.

En un vector de expresión de la presente descripción, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-AXL pueden comprender o estar asociados con cualquier promotor, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión adecuados. Los ejemplos de tales elementos incluyen promotores de expresión fuertes (p. ej., promotor/potenciador de CMV IE humano, así como promotores RSV, SV40, SL3-3, MMTV y LTR de VIH), secuencias de terminación de poli(A) eficaces, un origen de replicación para el plásmido producto en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable, y/o un sitio de clonación conveniente (p. ej., un policonector). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como CMV IE (el experto en la técnica reconocerá que tales términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica bajo ciertas condiciones).

El vector de expresión que codifica el anticuerpo anti-AXL se puede colocar y/o administrar a la célula anfitriona o animal anfitrión a través de un vector viral.

La presente descripción se refiere a una célula anfitriona eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo anti-AXL de la invención como se define en la presente memoria o una molécula biespecífica de la invención como se define en la presente memoria. Los ejemplos de células anfitrionas incluyen células de levadura, bacterias y mamíferos, tales como células CHO o HEK o derivados de las mismas. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-AXL de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-AXL de la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una célula anfitriona que comprende un vector de acuerdo con cualquier aspecto y realizaciones descritas en la presente memoria. Los anticuerpos anti-AXL descritos en la presente memoria se proporcionan mediante el uso de células anfitrionas recombinantes eucarióticas, procarióticas o microbianas que producen el anticuerpo. Por consiguiente, la invención proporciona una célula anfitriona recombinante, tal como una célula anfitriona procariótica recombinante, eucariótica recombinante o microbiana recombinante. Los ejemplos de células anfitrionas incluyen células de levadura, bacterianas y de mamífero, tales como las células CHO o HEK-293. Por ejemplo, en una realización, la célula anfitriona comprende un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-AXL descrito en la presente memoria. La célula anfitriona puede comprender un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un primer o segundo polipéptido descritos en la presente memoria. La célula anfitriona puede comprender un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-AXL, un primer o un segundo polipéptido descritos en la presente memoria.

Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), como se emplea en la presente memoria, se refiera a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Se debe entender que dichos términos están destinados a referirse no solo a la célula sujeto concreta, sino también a la progenie de tal célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula anfitriona" como se emplea en la presente memoria. Las células anfitrionas recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK-293, células PER.C6, células NS0 y células linfocíticas, y células procarióticas tales como *E. coli* y otros anfitriones eucarióticos tales como las células vegetales y los hongos.

El término "transfectoma", como se emplea en la presente memoria, incluye células anfitrionas eucarióticas recombinantes que expresan el anticuerpo o un antígeno diana, tales como células CHO, células PER.C6, células NS0, células HEK-293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria. Por lo tanto, se puede obtener un anticuerpo a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas obtenidas de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener a partir de

hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o de mamíferos no humanos tales como conejos, ratas, perros, primates, etc.

5 Se pueden generar anticuerpos humanos utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos, p. ej. ratones HuMAb, que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. El ratón HuMAb contiene un minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera y κ humana no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena γ y κ endógenos [96]. En consecuencia, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, experimentan cambio de clase y mutación somática para generar IgG humana de alta afinidad, anticuerpos monoclonales κ [96], [97], [98] y [99]. La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en [100], [101], [102], [103] y [104]. Véanse también [105] a [121]. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden utilizar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

15 Adicionalmente, se pueden identificar anticuerpos humanos de la presente descripción o anticuerpos de la presente invención de otras especies a través de tecnologías de tipo presentación, que incluyen, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación en ribosomas, presentación en mamíferos, presentación en levadura y otros mecanismos conocidos en la técnica, y las moléculas resultantes se pueden someter a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales mecanismos son bien conocidos en la técnica.

20 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria, que comprende las etapas de

- 25 a) cultivar una célula anfitriona o hibridoma de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria; y
b) purificar el anticuerpo de los medios de cultivo.

Aplicaciones terapéuticas

30 En otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo, anticuerpo biespecífico, o producto inmunoconjugado o ADC de la presente invención, como se define en cualquier aspecto o realización de la presente, para uso como medicamento.

35 Los anticuerpos anti-AXL de la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento o prevención de trastornos que implican células que expresan AXL. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden administrar a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo* o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar o prevenir trastornos que implican células que expresan AXL. Como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" es típicamente un humano al que se administra el anticuerpo anti-AXL o ADC. Los sujetos pueden incluir, por ejemplo, pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse modulando la función AXL o destruyendo la célula que expresa AXL, directa o indirectamente.

40 En un aspecto, la presente invención se refiere al anticuerpo, anticuerpo biespecífico o producto inmunoconjugado de la presente invención, como se define en cualquier aspecto o realización de la presente, para su uso en el tratamiento del cáncer.

45 La presente descripción proporciona un método para modular la señalización asociada a AXL en una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un anticuerpo anti-AXL o ADC de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria.

50 La presente descripción proporciona un método para destruir una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un anticuerpo anti-AXL o ADC de la invención. Sin estar limitados por la teoría, el entrecruzamiento o agrupación mediada por anticuerpos o mediada por ADC (p. ej., debido a la región Fc de los anticuerpos unidos a AXL que se unen a las células que expresan FcR) de las moléculas de AXL en la superficie de una célula puede conducir a la apoptosis de la célula.

55 La presente descripción proporciona un método para destruir una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un anticuerpo específico para AXL o ADC de la invención en presencia de células efectoras capaces de inducir una respuesta celular dependiente de Fc tal como ADCC o ADCP. En esta realización, el anticuerpo es típicamente completo y de un isotipo que conduce a una respuesta ADCC o ADCP, tal como, por ejemplo, un isotipo IgG1, κ .

60 La presente descripción proporciona un método para destruir una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un anticuerpo específico de AXL o ADC de la invención en presencia de proteínas del complemento, tales como proteínas del complemento presentes en el suero humano normal, que se pueden activar e induciendo así

CDC después de la unión del anticuerpo específico de AXL o ADC a la membrana plasmática de las células que expresan AXL. El anticuerpo es típicamente completo y de un isotipo capaz de inducir la activación del sistema del complemento, tal como, por ejemplo, un isotipo IgG1,k.

5 Los anticuerpos anti-AXL de la invención se pueden caracterizar por la internalización tras la unión a AXL, haciéndolos adecuados para un enfoque de ADC utilizando un ADC como se describe en cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria.

10 En consecuencia, la descripción proporciona un método para destruir una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un ADC de acuerdo con la presente descripción, que requiere internalización y tráfico a lisosomas para la escisión proteolítica específica (es decir, conector escindible) o no específica (conector no escindible) del complejo de anticuerpo anti-AXL-conector-fármaco.

15 La presente descripción se refiere a un método para interferir en la regulación mediada por AXL de la respuesta inmunitaria innata o adaptativa, tal como mediante la unión de un anticuerpo específico de AXL o ADC de acuerdo con la invención a macrófagos, células dendríticas o células NK que expresan AXL.

20 La presente descripción proporciona un método para destruir una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un ADC de la invención en donde el anticuerpo anti-AXL está conectado a un radical terapéutico a través de un conector que permite la liberación del fármaco una vez que el ADC se internaliza, por ejemplo, mediante un cambio en el pH o condiciones reductoras. La tecnología de conectores adecuada es conocida en la técnica, como se ha descrito anteriormente.

25 La presente descripción proporciona métodos para tratar o prevenir un trastorno que implica células que expresan AXL en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-AXL, anticuerpo biespecífico o ADC de la presente invención a un sujeto que lo necesite. El método típicamente implica administrar a un sujeto un anticuerpo anti-AXL, un anticuerpo biespecífico o ADC según la presente invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno.

30 Un anticuerpo anti-AXL o ADC según la presente invención se puede administrar profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de un evento en la progresión del cáncer o reducir el riesgo de recurrencia cuando un cáncer está en remisión y/o de ha extirpado quirúrgicamente un tumor primario. En el último caso, el anticuerpo anti-AXL podría, por ejemplo, administrarse asociado con (es decir, antes, durante o después) de la cirugía. La administración profiláctica también puede ser útil en pacientes en los que es difícil localizar un tumor que se cree que está presente debido a otros factores biológicos.

35 Las células con alta expresión de AXL, tal como expresión en exceso o expresión aberrante de AXL, como se encuentra en algunas células cancerosas, son dianas particularmente buenas para los anticuerpos anti-AXL, anticuerpos biespecíficos o ADC de la invención, ya que se pueden unir más anticuerpos o ADC por célula tumoral. Los tejidos que expresan heterogéneamente AXL, tales como tejido tumoral, también pueden ser una diana adecuada para los anticuerpos anti-AXL, anticuerpos biespecíficos, ADC o anti-AXL-ADC de la invención. Por lo tanto, el trastorno que implica células que expresan AXL puede ser cáncer, es decir, un trastorno tumorigénico, tal como un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan AXL que incluyen, por ejemplo, trastornos en los que las células son de un tumor sólido o tumor hematológico. La expresión de AXL se ha descrito, por ejemplo, en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM; [122]), cáncer de páncreas [123], cáncer de esófago [124], cáncer de endometrio [125].

50 Las células ilustrativas que expresan AXL incluyen células cancerosas tales como, p. ej., células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas y cáncer de esófago.

La presente descripción proporciona métodos para tratar o prevenir el cáncer que comprenden administrar el anticuerpo, el anticuerpo biespecífico, el producto inmunoconjugado, la composición o la composición farmacéutica según la presente invención a un sujeto que lo necesite.

55 El cáncer puede ser un tumor sólido que expresa AXL o un cáncer hematológico que expresa AXL. El cáncer hematológico puede ser leucemia mieloide aguda (AML). El tumor sólido que expresa AXL puede ser cáncer de pulmón o carcinoma epidermoide.

60 Por lo tanto, la presente descripción se refiere a métodos que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-AXL o ADC de la presente invención a un sujeto que lo necesite.

La presente descripción se refiere a un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula tumoral que expresa AXL, que comprende la administración, a un individuo que lo necesite, de un anticuerpo, anticuerpo biespecífico, producto inmunoconjugado, composición o composición farmacéutica de acuerdo con cualquier

aspecto o realización descritos en la presente memoria.

5 La presente descripción se refiere a un método para inhibir la migración y/o la invasión de una célula tumoral que expresa AXL, que comprende la administración, a un individuo que lo necesite, de un anticuerpo, anticuerpo biespecífico, producto inmunoconjugado, composición o composición farmacéutica de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria.

10 La presente descripción se refiere a un método para inhibir la resistencia a la terapia dirigida, tal como la terapia dirigida a EGFR o BRAF, o a agentes quimioterapéuticos, que comprende la administración, a un individuo que lo necesite, de un anticuerpo, anticuerpo biespecífico, producto inmunoconjugado, composición, o composición farmacéutica de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria.

15 La presente descripción se refiere a un método para dirigir o inhibir macrófagos asociados a tumores, que comprende la administración, a un individuo que lo necesite, de un anticuerpo, anticuerpo biespecífico, producto inmunoconjugado, composición o composición farmacéutica de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria.

20 La presente descripción proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor sólido, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-AXL o ADC de la presente invención a un sujeto que lo necesite, y en donde el tumor sólido es un melanoma, carcinoma, sarcoma, adenoma y/o un glioma. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer endometrial/cervical, cáncer de pulmón (tal como, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de piel, melanoma maligno y cáncer de páncreas.

25 El cáncer puede ser cáncer de páncreas, tal como el cáncer de páncreas avanzado o metastásico no resecable. El cáncer puede ser endometrial/cervical o pulmonar. El cáncer puede ser un cáncer de tiroides. El cáncer puede ser un cáncer de colon. El cáncer puede ser un cáncer de riñón. El cáncer puede ser cáncer de ovario. El cáncer puede ser cáncer de mama, tal como cáncer de receptor de estrógeno alfa negativo o de receptor de estrógeno alfa positivo. El cáncer puede ser cáncer de mama triple negativo (es decir, cáncer de mama con resultados negativos para receptores de estrógenos (ER-), receptores de progesterona (PR-) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-)). El cáncer puede ser cáncer de esófago. El cáncer puede ser cáncer de piel. El cáncer puede ser melanoma tal como melanoma maligno. El cáncer puede ser leucemia mieloide aguda (AML). El cáncer puede ser resistente a quimioterapia, inhibidores de tirosina quinasa e inhibidores de BRAF. El cáncer puede ser resistente a la terapia dirigida a EGFR.

30 La presente descripción se refiere a un anticuerpo que se une al dominio extracelular de AXL tal como el dominio de tipo Ig1 de AXL, en donde dicho anticuerpo es para su uso como medicamento. Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo, o un producto inmunoconjugado, de acuerdo con cualquiera de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente para su uso como medicamento.

35 En particular, el anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso como medicamento.

40 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

45 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de tiroides.

50 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de colon.

55 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el

tratamiento o prevención del cáncer de riñón.

5 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de ovario.

10 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de mama.

15 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de mama triple negativo.

20 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de esófago.

25 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de piel.

30 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención de melanoma tal como melanoma maligno.

35 El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de pulmón (tal como, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)).

40 El anticuerpo puede tener al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo es para su uso en el tratamiento o prevención de la leucemia mieloide aguda (AML).

45 La presente descripción proporciona tratamiento o prevención del cáncer. Los anticuerpos utilizados de acuerdo con la descripción pueden estar acoplados o unidos a un agente citotóxico para aumentar la eficacia o el efecto del tratamiento.

50 Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden conectar a un agente citotóxico tal como una auristatina (tal como, por ejemplo, monometil auristatina E (MMAE)) para formar un producto inmunoconjugado para su uso como medicamento, tal como por ejemplo para el tratamiento o la prevención del cáncer.

La presente descripción se refiere a un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a AXL, en donde el anticuerpo no compite por la unión a AXL con el ligando Gas6.

55 La descripción se refiere a un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo se conecta a la monometil auristatina E para formar un producto inmunoconjugado, y dicho producto inmunoconjugado es para su uso como medicamento.

60 La descripción se refiere a un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo se conecta a la monometil auristatina E para formar un producto

tal como melanoma maligno. El anticuerpo se puede conectar a la monometil auristatina E mediante el conector mc-vc-PAB.

La presente descripción se refiere a un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo se conecta a la monometil auristatina E para formar un producto inmunoconjugado, y dicho producto inmunoconjugado es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de pulmón. El anticuerpo se puede conectar a la monometil auristatina E mediante el conector mc-vc-PAB.

La descripción preestablecida se refiere a un producto inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias de SEQ ID NO: 39, GAS y 40, en donde dicho anticuerpo se conecta a la monometil auristatina E para formar un producto inmunoconjugado, y dicho producto inmunoconjugado es para su uso en el tratamiento o prevención de la leucemia mieloide aguda. El anticuerpo se puede conectar a la monometil auristatina E mediante el conector mc-vc-PAB.

El anticuerpo se puede conectar a un agente citotóxico tal como una auristatina para formar un producto inmunoconjugado. El anticuerpo y el agente citotóxico se pueden conectar mediante un conector de maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloicarbónico (mc-vc-PAB).

La selección de pacientes que se deben tratar con anticuerpos anti-AXL se puede basar en el nivel de expresión de AXL en una muestra, tal como una muestra que contiene células tumorales, o mediante la detección de tumores que expresan AXL utilizando anticuerpos anti-AXL o fragmentos de anticuerpos marcados, p. ej., los de la invención. En la presente memoria se describen ensayos de diagnóstico ilustrativos para determinar la expresión de AXL utilizando anticuerpos contra AXL de la invención. Las dosis eficaces y los regímenes de dosificación para el anticuerpo anti-AXL o ADC dependen de la enfermedad o afección que se vaya a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la técnica.

Un médico con un conocimiento práctico normal de la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Con respecto a esto, cuando se hace referencia a una composición farmacéutica, se debe entender que también comprende una composición como tal, o viceversa. Por ejemplo, el médico podría comenzar las dosis del anticuerpo anti-AXL empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición farmacéutica de la presente invención será la cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico de acuerdo con un régimen de dosificación concreto. Tal dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente.

Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para uso terapéutico se puede medir por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar, por ejemplo, en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir citotoxicidad mediante ensayos *in vitro* conocidos por el profesional experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto con un conocimiento práctico normal de la técnica podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Un intervalo no limitante ilustrativo para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-AXL de la presente invención es de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5, aproximadamente tal como 0,3, aproximadamente 1, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 8 mg/kg.

Un intervalo ilustrativo no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC anti-AXL de la invención es 0,02-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,02-30 mg/kg, tal como aproximadamente 0,05-10 mg/kg o 0,1-3 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5-2 mg/kg.

La administración puede ser, p. ej., intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y, por ejemplo, se puede administrar proximal al sitio de la diana.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la

respuesta deseada óptima (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

5 La ventana de eficacia-seguridad se puede optimizar disminuyendo la toxicidad específica, tal como por ejemplo disminuyendo la razón de fármaco-anticuerpo (DAR) y/o mezclando el ADC anti-AXL con el anticuerpo anti-AXL no marcado.

10 La eficacia del tratamiento se puede controlar durante la terapia, p. ej. en puntos predefinidos en el tiempo. La eficacia se puede controlar midiendo el nivel de AXL en una muestra que contiene células tumorales, mediante la visualización del área de la enfermedad o mediante otros métodos de diagnóstico descritos más adelante en la presente memoria, p. ej. realizando una o más exploraciones PET-CT, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-AXL marcado, fragmento o mini-anticuerpo derivado del anticuerpo específico de AXL de la presente invención.

15 Si se desea, se puede administrar una dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. En otra realización, los anticuerpos anti-AXL se administran por infusión continua lenta durante un largo período, tal como más de 24 horas, para minimizar cualquier efecto secundario no deseado.

20 Si bien es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica como se describió anteriormente.

25 También se puede administrar una dosis eficaz de un anticuerpo anti-AXL, un anticuerpo biespecífico o ADC de la invención utilizando un período de dosificación semanal, bisemanal o trisemanal. El período de dosificación puede restringirse, por ejemplo, a 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido la progresión clínica.

30 Por ejemplo, el anticuerpo anti-AXL, el anticuerpo biespecífico o el ADC se pueden administrar por infusión en una dosis semanal de entre 10 y 500 mg/m², tal como entre 200 y 400 mg/m². Tal administración se puede repetir, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración se puede realizar mediante infusión continua durante un período de 1 a 24 horas, tal como de 1 a 12 horas.

35 El anticuerpo anti-AXL, el anticuerpo biespecífico o el ADC se pueden administrar mediante perfusión cada tres semanas a una dosis de entre 10 y 500 mg/m², tal como entre 50-200 mg/m². Tal administración se puede repetir, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración se puede realizar mediante infusión continua durante un período de 1 a 24 horas, tal como de 1 a 12 horas.

40 Se puede administrar un ADC anti-AXL como una dosis única de aproximadamente 0,1-10 mg/kg, tal como aproximadamente 1-3 mg/kg, cada semana o cada tercera semana hasta doce veces, hasta ocho veces o hasta la progresión clínica. La administración se puede realizar mediante infusión continua durante un período de 1 a 24 horas, tal como de 1 a 12 horas. Tales regímenes se pueden repetir una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación se puede determinar o ajustar midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre tras la administración, por ejemplo, tomando una muestra biológica y utilizando anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a la región de unión al antígeno de los anticuerpos anti-AXL de la presente invención

45 Los anticuerpos anti-AXL se pueden administrar como terapia de mantenimiento, tal como, p. ej., una vez a la semana durante un período de seis meses o más.

50 Como ejemplos no limitantes, el tratamiento según la presente invención se puede proporcionar como una dosis diaria de un compuesto de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como 0,2, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o alternativamente, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquiera de sus combinaciones, utilizando dosis únicas o divididas cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquiera de sus combinaciones.

60 Las composiciones parenterales se pueden formular en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de la unidad de dosificación como se emplea en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se deben tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la presente invención está dictada por, y depende directamente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones

inherentes en la técnica de combinar tal compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Aplicaciones de diagnóstico

5 Los anticuerpos anti-AXL de la invención también se pueden utilizar para fines de diagnóstico, utilizando una composición que comprende un anticuerpo anti-AXL como se describe en la presente memoria. Por consiguiente, la invención proporciona métodos y composiciones de diagnóstico que utilizan los anticuerpos anti-AXL descritos en la presente memoria. Tales métodos y composiciones se pueden utilizar con fines puramente diagnósticos, por ejemplo, para detectar o identificar una enfermedad que implica células que expresan AXL, así como para verificar el progreso de los tratamientos terapéuticos, verificar la progresión de la enfermedad, evaluar el estado después del tratamiento, verificar la recurrencia de la enfermedad, evaluar el riesgo de desarrollar una enfermedad, y similares.

15 Se pueden utilizar los anticuerpos anti-AXL de la presente invención *ex vivo*, tal como en el diagnóstico de una enfermedad en la cual las células que expresan AXL son indicativas de enfermedad o están implicadas en la patogénesis, al detectar niveles de AXL o niveles de células que expresan AXL en su superficie celular en una muestra tomada de un paciente. Esto se puede lograr, por ejemplo, poniendo en contacto la muestra que se debe analizar, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo anti-AXL en condiciones que permitan la unión del anticuerpo a AXL. A continuación, se puede detectar la formación de complejos (p. ej., utilizando un ELISA). Cuando se utiliza una muestra de control junto con la muestra de prueba, el nivel de anticuerpo anti-AXL o complejo de anticuerpo anti-AXL-AXL se analiza en ambas muestras y un nivel estadísticamente significativo más alto de anticuerpo anti-AXL o complejo de anticuerpo anti-AXL-AXL en la muestra de prueba indica un mayor nivel de AXL en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control.

25 Los ejemplos de inmunoensayos convencionales en los que se pueden utilizar anticuerpos anti-AXL de la presente invención incluyen, sin limitación, ensayos ELISA, RIA, FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica tisular, transferencia Western y/o inmunoprecipitación.

30 En una realización, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de antígeno AXL, o una célula que expresa AXL, en una muestra que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-AXL de la invención en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-AXL a AXL en la muestra; y
- analizar si se ha formado un complejo. Típicamente, la muestra es una muestra biológica. El término "antígeno AXL", como se emplea en este contexto, se refiere tanto al antígeno AXL soluble como unido a la célula.

35 La muestra puede ser una muestra de tejido conocida o sospechosa de contener antígeno AXL y/o células que expresan AXL. Por ejemplo, la detección *in situ* de la expresión de AXL se puede llevar a cabo retirando una muestra histológica de un paciente y proporcionando el anticuerpo de la presente invención a dicha muestra. El anticuerpo se puede proporcionar aplicando o superponiendo el anticuerpo a la muestra, que después se detecta utilizando medios adecuados. A continuación, es posible determinar no solo la presencia de AXL o células que expresan AXL, sino también la distribución de AXL o células que expresan AXL en el tejido examinado (p. ej., en el contexto de evaluar la propagación de células cancerosas). Utilizando la presente invención, los expertos en la técnica percibirán fácilmente que se puede modificar cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los procedimientos de tinción) para lograr tal detección *in situ*.

40 En los ensayos anteriores, el anticuerpo anti-AXL se puede marcar con una sustancia detectable para permitir que se detecte el anticuerpo unido a AXL. Alternativamente, el anticuerpo anti-AXL unido (primario) puede ser detectado por un anticuerpo secundario que está marcado con una sustancia detectable y que se une al anticuerpo primario. Además, en los ensayos anteriores, se puede utilizar una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo o un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquier aspecto o realizaciones descritos en la presente memoria. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo o anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria.

55 El nivel de AXL en una muestra también se puede estimar mediante un inmunoensayo de competición que utiliza patrones de AXL marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-AXL no marcado. En este tipo de ensayo, la muestra biológica, los patrones de AXL marcados y el anticuerpo anti-AXL se combinan, y se determina la cantidad de patrón de AXL marcado unido al anticuerpo anti-AXL no marcado. La cantidad de AXL en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de AXL marcado unido al anticuerpo anti-AXL.

60 Las marcas adecuadas para el anticuerpo anti-AXL, el anticuerpo secundario y/o el patrón de AXL utilizados en las técnicas de diagnóstico *in vitro* incluyen, sin limitación, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen

5 peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^3H .

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para detectar la presencia de antígeno AXL o una célula que expresa AXL, en una muestra, que comprende:

- 10
- un anticuerpo anti-AXL, anticuerpo biespecífico o producto inmunoconjugado o ADC de la invención; y
 - instrucciones de uso del kit.

15 La presente descripción proporciona un kit para el diagnóstico de cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo anti-AXL y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo anti-AXL a AXL. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcas fluorescentes, marcas enzimáticas u otras marcas detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que se puede visualizar. La presente descripción proporciona un kit de diagnóstico que comprende uno o más anticuerpos anti-AXL, de la presente invención en forma marcada o sin marcar en recipientes adecuados, reactivos para las incubaciones para un ensayo indirecto y sustratos o agentes de derivatización para la detección en tal ensayo, dependiendo de la naturaleza de la marca. También se pueden incluir reactivos de control e instrucciones de uso.

20

También se pueden suministrar kits de diagnóstico para su uso con un anticuerpo anti-AXL, tal como un anticuerpo anti-AXL conjugado/marcado, para la detección de la presencia de AXL en una muestra de tejido o anfitrión. Por lo tanto, el anticuerpo anti-AXL según la presente invención también se puede utilizar p. ej., como parte de un diagnóstico complementario, por ejemplo, como anticuerpo primario en un ensayo de inmunohistoquímica diseñado para detectar la expresión de AXL en tumores sólidos, ganglios linfáticos u otras biopsias de tejido. Alternativamente, los anticuerpos anti-AXL según la presente invención se pueden utilizar como el anticuerpo primario en un ensayo basado en citometría de flujo o inmunocitoquímica para identificar células que expresan AXL en sangre, médula ósea, aspirados de agujas finas, p. ej. aspirados de ganglios linfáticos o líquido peritoneal para identificar células tumorales que expresan AXL. Los anticuerpos anti-AXL según la presente invención se pueden utilizar para identificar AXL soluble, p. ej. en un ensayo basado en ELISA. Los anticuerpos anti-AXL según la presente invención se pueden utilizar como diagnóstico complementario, por ejemplo, como productos radioconjugados, que se pueden utilizar para estudios de generación de imágenes en pacientes. En tales kits de diagnóstico, así como en kits para usos terapéuticos descritos en otra parte de la presente memoria, un anticuerpo anti-AXL se puede proporcionar típicamente en forma liofilizada en un recipiente, solo o junto con anticuerpos adicionales específicos para una célula o péptido diana. Típicamente, también están incluidos un portador farmacéuticamente aceptable (p. ej., un diluyente inerte) y/o componentes del mismo, tales como un tampón Tris, fosfato o carbonato, estabilizadores, conservantes, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, albúmina sérica o similares, (típicamente en un recipiente separado para su mezcla) y reactivos adicionales (también generalmente en recipientes separados). En ciertos kits, también se incluye un anticuerpo secundario capaz de unirse al Ab específico de AXL, que típicamente está presente en un recipiente separado. El segundo anticuerpo típicamente se conjuga con un marcador y se formula de manera similar al anticuerpo anti-AXL de la presente invención. Utilizando los métodos descritos anteriormente y en otra parte de la presente memoria, los anticuerpos anti-AXL se pueden utilizar para definir subconjuntos de células cancerosas/tumorales y caracterizar tales células y tejidos tumorales relacionados.

25

30

35

40

45

Anticuerpos antiidiotípicos

50 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo antiidiotípico que se une a un anticuerpo anti-AXL de la invención como se describe en la presente memoria.

Un anticuerpo antiidiotípico (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo anti-Id inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético que la fuente de anticuerpo monoclonal anti-AXL con el anticuerpo monoclonal contra el cual se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado típicamente puede reconocer y responder a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Tales anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento US 4.699.880. Tales anticuerpos son características adicionales de la presente invención.

55

60 Un anticuerpo anti-Id también se puede utilizar como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo un denominado anti-anticuerpo anti-Id. Un anti-anticuerpo anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al anticuerpo monoclonal original, que indujo el anticuerpo anti-Id. Por lo tanto, al utilizar anticuerpos para los determinantes idiotípicos de un anticuerpo monoclonal, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica. Los anticuerpos anti-Id se pueden variar (produciendo así variantes de

5 anticuerpos anti-Id) y/o derivatizarse mediante técnicas cualesquiera adecuadas, tales como las descritas en otra parte en la presente memoria con respecto a los anticuerpos específicos de AXL de la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-Id se puede acoplar a un portador como la hemocianina de lapa californiana (KLH) y utilizar para inmunizar ratones BALB/c. Los sueros de estos ratones típicamente contendrán anti-anticuerpos anti-Id que tienen propiedades de unión similares, si no idénticas, a un anticuerpo anti-AXL original/parental.

Secuencias

Tabla 1

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:1	VH 107	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMNWW RQAPGKGLEWVSTT <u>ISGSGAST</u> YYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>AKIWIAFDI</u> WGQGMV TVSS	Ab que se une al dominio Ig1 de HCo12-BalbC
SEQ ID NO:2	VL 107	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSSY</u> LAWYQQ KPGQAPRLLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYC <u>QQYGSSPYT</u> FGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:3	VH 140	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMTWVR QAPGKGLEWVSA <u>ISISGAST</u> FYADSVKGRFTISRDN TSLQMNSLRAEDTAVYFC <u>RGYSGYVYDAFDI</u> WGQGT MVTVSS	
SEQ ID NO:4	VL 140	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <u>QGISNWL</u> LAWYQ QKPEKAPKSLIY <u>AAS</u> LSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYC <u>QQYNSYPLT</u> FGGGTKVEIK	
SEQ ID NO:5	VH 148	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMTWVR QAPGKGLEWVSA <u>ISISGGST</u> FYADSVKGRFTISRDN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>RGYSGYVYDAFDF</u> WGQGT MVTVSS	Ab que se une al dominio Ig2 de HCo12-BalbC
SEQ ID NO:6	VL 148	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <u>QGISNWL</u> LAWYQ QKPEKAPKSLIY <u>AAS</u> LSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYC <u>QQYNSYPLT</u> FGGGTKVEIK	
SEQ ID NO:7	VH 154	EVQLDSSGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMSWVR QAPGKGLEWVSA <u>ISIGGGNA</u> YYADSVKGRFTISRDN NTLYLQMNSLRAADTAVYYC <u>AKPGFIMVRGPLDY</u> WG QGALVTVSS	Ab que se une al dominio FN1 de HCo12-BalbC

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:8	VH 154-M103L	EVQLDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISIGGGNAYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAADTAVYYCAKPGFILVRGPLDYWGQ GALVTVSS	
SEQ ID NO:9	VL 154	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVNSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPYTFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:10	VH 171	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSDISVSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGYIWFGESLSYAFDI WGQGTMTVTVSS	Ab que se une al dominio Ig2 de HCo17-BalbC
SEQ ID NO:11	VL 171	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGRSFTFGPGTKVDIK	
SEQ ID NO:12	VH 172	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSDISVSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGYIWFGESLSYAFDI WGQGTMTVTVSS	
SEQ ID NO:13	VL 172	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGRSFTFGPGTKVDIK	
SEQ ID NO:14	181 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSDISVSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLHMNSLRAEDTAVYYCAKEGYIWFGESLSYAFDI WGQGTMTVTVSS	
SEQ ID NO:15	VH 181	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGRSFTFGPGTKVDIK	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:16	VH 183	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GGSFSGYY</u> WSWI RQPPGKGLEWIGE <u>INQSGST</u> NYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTSVYYC <u>ASGNWDHFFDY</u> WGQGLTV TVSS	Ab que se une al dominio FN1 de HCo17-BalbC
SEQ ID NO:17	VH 183-N52Q	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GGSFSGYY</u> WSWI RQPPGKGLEWIGE <u>IQQSGST</u> NYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTSVYYC <u>ASGNWDHFFDY</u> WGQGLTV TVSS	
SEQ ID NO:18	VL 183	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQ HKPGKAPKLLIY <u>AT</u> SLQSGVTSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYC <u>QQA</u> KSPWTFGQGTKVEIK	
SEQ ID NO:19	VH 187	QVPLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GGSFSGYH</u> WSWI RQPPGKGLEWIGE <u>ISHSGRT</u> NYNPSLKSRVTISIDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYC <u>CASFITMIRGTIITHFDY</u> WGQGT LTVSS	
SEQ ID NO:20	VL 187	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQ KPEKAPKSLIY <u>AAS</u> LQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYC <u>QQYHSYPY</u> TFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:21	VH 608-01	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS <u>GGTFSSYA</u> ISWVR	
		QAPGQGLEWMGRI <u>IPFGIA</u> NYVQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRAEDTAVYYC <u>ARRGDYYGSGSPDVFDI</u> W GQGTMTVSS	
SEQ ID NO:22	VL 608-01	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>QVSSSY</u> LAWYQQ KPGQAPRLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLE PEDFAVYYC <u>QQYGS</u> SYTFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:23	VH 610-01	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS <u>GGTFSSYA</u> ISWVR QAPGQGLEWMGRI <u>IPFGIA</u> NYVQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRAEDTAVYYC <u>ARRGNYYGSGSPDVFDI</u> W GQGTMTVSS	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:24	VL 610-01	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSYTFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:25	VH 613	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWM RQAPGQGLEWMGRIIPIFGIVNYAQKFQGRVTLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGNYYGSGSPDVFDI WGQGMVTVSS	Ab que se une al dominio Ig1 de HCo20
SEQ ID NO:26	VL 613	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSYTFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:27	VH 613-08	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWM RQAPGQGLEWMGRIIPIFGIVNYAQKFQGRVTLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGNYYGSGSPDVFDI WGQGMVTVSS	
SEQ ID NO:28	VL 613-08	EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEP EDFAVYYCQQRSNWLTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO:29	VH 620-06	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGRIIPIFGIANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGNYYGSGSPDVFDI WGQGMVTVSS	
SEQ ID NO:30	VL 620-06	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSYTFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:31	VH 726	QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTC AIDGGSFSGYYWSWIR QPPGKLEWIGEISHSGRTNYPNPKSRVTISIDTSKNQF SLKLSVAAADTAVYYCARFITMIRGAIITFDYWGQGA LVTVSS	Ab que se une al dominio FN2 de HCo17-BalbC

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:32	VH 726-M101L	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAID <u>GGSFSGYY</u> WSWIR QPPGKGLEWIGE <u>ISHSGRT</u> NYNPSLRSRVTISIDTSKNQF SLKLSSVAAADTAVYYC <u>ARFITLIRGAIITHFDY</u> WGQGAL VTVSS	
SEQ ID NO:33	VL 726	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQ KPEKAPKSLIY <u>AAS</u> SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYC <u>QQYHSYPY</u> TFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:34	VH 733	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <u>GFSFSTY</u> AMHWV RQAPGKLEWVAVI <u>SYDGD</u> NKYSADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARGRKL</u> GIDAFDIWGQ GTMVTVSS	Ab que se une al dominio FN1 de HCo17-BalbC
SEQ ID NO:35	VL 733	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISSA</u> LAWYQQK PGKAPKLLIY <u>DAS</u> LESQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISGLQP EDFATYYC <u>QQFN</u> SYPYTFGPGTKVDIK	
SEQ ID NO:36	CDR1 de VH 107	GFTFSSYA	
SEQ ID NO:37	CDR2 de VH 107	TSGSGAST	
SEQ ID NO:38	CDR3 de VH 107	AKIWIAFDI	
SEQ ID NO:39	CDR1 de VL 107	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 107	GAS	
SEQ ID NO:40	CDR3 de VL 107	QQYGSSPYT	
SEQ ID NO:41	CDR1 de VH 140	GFTFSSYA	
SEQ ID NO:42	CDR2 de VH 140	ISISGAST	
SEQ ID NO:43	CDR3 de VH 140	RGYSGYVYDAFDI	
SEQ ID NO:44	CDR1 de VL 140	QGISNW	
	CDR2 de VL 140	AAS	
SEQ ID NO:45	CDR3 de VL 140	QQYNSYPLT	
SEQ ID NO:46	CDR1 de VH 148	GFTFSSYA	
SEQ ID NO:47	CDR2 de VH 148	ISISGGST	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:48	CDR3 de VH 148	RGYSGYVYDAFDF	
SEQ ID NO:49	CDR1 de VL 148	QGISNW	
	CDR2 de VL 148	AAS	
SEQ ID NO:50	CDR3 de VL 148	QQYNSYPLT	
SEQ ID NO:51	CDR1 de VH 154	GFTFSSYA	
SEQ ID NO:52	CDR2 de VH 154	ISIGGGNA	
SEQ ID NO:53	CDR3 de VH 154	AKPGFIMVRGPLDY	
SEQ ID NO:54	CDR3 de VH 154-M103L	AKPGFILVRGPLDY	
SEQ ID NO:55	CDR1 de VL 154	QSVSNSY	
	CDR2 de VL 154	GAS	
SEQ ID NO:56	CDR3 de VL 154	QQYGSSPYT	
SEQ ID NO:57	CDR1 de VH 171	GFTFSSYA	
SEQ ID NO:58	CDR2 de VH 171	ISVSGGST	
SEQ ID NO:59	CDR3 de VH 171	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
SEQ ID NO:60	CDR1 de VL 171	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 171	GAS	
SEQ ID NO:61	CDR3 de VL 171	QQYGRSFT	
SEQ ID NO:62	CDR1 de VH 172	GFTFSNYA	
SEQ ID NO:63	CDR2 de VH 172	ISVSGGST	
SEQ ID NO:64	CDR3 de VH 172	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
SEQ ID NO:65	CDR1 de VL 172	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 172	GAS	
SEQ ID NO:66	CDR3 de VL 172	QQYGRSFT	
SEQ ID NO:67	CDR1 de VH 181	GFTFSSYA	
SEQ ID NO:68	CDR2 de VH 181	ISVSGGST	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:69	CDR3 de VH 181	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
SEQ ID NO:70	CDR1 de VL 181	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 181	GAS	
SEQ ID NO:71	CDR3 de VL 181	QQYGRSFT	
SEQ ID NO:72	CDR1 de VH 183	GGSFSGYY	
SEQ ID NO:73	CDR2 de VH 183	INQSGST	
SEQ ID NO:74	CDR2 de VH 183-N52Q	IQQSGST	
SEQ ID NO:75	CDR de VH 3183	ASGNWDHFFDY	
SEQ ID NO:76	CDR1 de VL 183	QGISSW	
	CDR2 de VL 183	ATS	
SEQ ID NO:77	CDR3 de VL 183	QQAKSFPWT	
SEQ ID NO:78	CDR1 de VH 187	GGSFSGYH	
SEQ ID NO:79	CDR2 de VH 187	ISHSGRT	
SEQ ID NO:80	CDR3 de VH 187	ASFITMIRGTIITHFDY	
SEQ ID NO:81	CDR1 de VL 187	QGISSW	
	CDR2 de VL 187	AAS	
SEQ ID NO:82	CDR3 de VL 187	QQYHSYPYT	
SEQ ID NO:83	CDR1 de VH 608-01	GGTFSSYA	
SEQ ID NO:84	CDR2 de VH 608-01	IIPIFGIA	
SEQ ID NO:85	CDR3 de VH 608-01	ARRGDYYGSGSPDVFDI	
SEQ ID NO:86	CDR1 de VL 608-01	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 608-01	GAS	
SEQ ID NO:87	CDR3 de VL 608-01	QQYGSSYT	
SEQ ID NO:88	CDR1 de VH 610-01	GGTFSSYA	
SEQ ID NO:89	CDR2 de VH 610-01	IIPIFGIA	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:90	CDR3 de VH 610-01	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
SEQ ID NO:91	CDR1 de VL 610-01	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 610-01	GAS	
SEQ ID NO:92	CDR3 de VL 610-01	QQYGSSYT	
SEQ ID NO:93	CDR1 de VH 613	GGTFSSYA	
SEQ ID NO:94	CDR2 de VH 613	IIPIFGIV	
SEQ ID NO:95	CDR3 de VH 613	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
SEQ ID NO:96	CDR1 de VL 613	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 613	GAS	
SEQ ID NO:97	CDR3 de VL 613	QQYGSSYT	
SEQ ID NO:98	CDR1 de VH 613-08	GGTFSSYA	
SEQ ID NO:99	CDR2 de VH 613-08	IIPIFGIV	
SEQ ID NO:100	CDR3 de VH 613-08	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
SEQ ID NO:101	CDR1 de VL 613-08	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 613-08	DAS	
SEQ ID NO:102	CDR3 de VL 613-08	QQRSNWLT	
SEQ ID NO:103	CDR1 de VH 620-06	GGTFSSYA	
SEQ ID NO:104	CDR2 de VH 620-06	IIPIFGIA	
SEQ ID NO:105	CDR3 de VH 620-06	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
SEQ ID NO:106	CDR1 de VL 620-06	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 620-06	GAS	
SEQ ID NO:107	CDR3 de VL 620-06	QQYGSSYT	
SEQ ID NO:108	CDR1 de VH 726	GGSFSGYY	
SEQ ID NO:109	CDR2 de VH 726	ISHSGRT	
SEQ ID NO:110	CDR3 de VH 726	ARFITMIRGAIITHFDY	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:111	CDR3 de VH 726-M101L	ARFITLIRGAIITHFDY	
SEQ ID NO:112	CDR1 de VL 726	QGISSW	
	CDR2 de VL 726	AAS	
SEQ ID NO:113	CDR3 de VL 726	QQYHSYPYT	
SEQ ID NO:114	CDR1 de VH 733	GFSFSTYA	
SEQ ID NO:115	CDR2 de VH 733	ISYDGDNK	
SEQ ID NO:116	CDR3 de VH 733	ARGRKLGIDAFDI	
SEQ ID NO:117	CDR1 de VL 733	QGISSA	
	CDR2 de VL 733	DAS	
SEQ ID NO:118	CDR3 de VL 733	QQFNSYPFT	
SEQ ID NO:119	CDR2 de VH de dominio Ig2	ISISGXST - en donde X es A o G	
SEQ ID NO:120	CDR3 de VH de dominio Ig2	RGYSGYVYDAFDX - en donde X es I o F	
SEQ ID NO:121	CDR1 de VH de dominio FN2	GGSFSGYX - en donde X es H o Y	
SEQ ID NO:122	CDR3 de VH de dominio FN2	AX1FITMIRGX2IITHFDY - en donde X1 es S o R; y X2 es T o A	
SEQ ID NO:123	CDR1 de VH de dominio FN1	GFTFSXYA - en donde X es S o N	
SEQ ID NO:124	CDR2 de VH de dominio FN1	ISVSGGST	
SEQ ID NO:125	CDR3 de VH de dominio FN1	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
SEQ ID NO:126	CDR2 de VH de dominio Ig1	IPIFIGIX - en donde X es A o V	
SEQ ID NO:127	CDR3 de VH de dominio Ig1	ARRGXYYGSGSPDVFDI - en donde X es D o N	
SEQ ID NO:128	CDR1 de VL de dominio Ig1	QSVXSSY - en donde X es S o del	
	CDR2 de VL de dominio Ig1	XAS - en donde X es D o G	
SEQ ID NO:129	CDR3 de VL de dominio Ig1	QQX1X2X3X4X5T - en donde X1 es R o Y; X2 es S o G; X3 es N o S; X4 es W o S; y X5 es L o Y	
SEQ ID NO:130	Proteína AXL humana (Swissprot P30530)		

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
		MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEES PFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRD GQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSD TGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGLLEGLPYFLEEPEDRTV AANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHG PQRSLHVPGLNKTSSFCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQ QPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLS DDGMGIQAGEPDPPEELTSQASVPPHQLRGLSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISA TRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEV LMDIGLRQEVTLLELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGP WSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAF5WPWWY VLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERG ELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVD RHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQD5SILKVAVKTM KIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGS ERESFPAPVVILPFMKHGD5LHSFLLYSRLGDQPVYLPTQ MLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENM SVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLAD RVYTSKSDVWSFGVTMWEIATR5GQTPYPGVENSEIYDY LRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTE LREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGA AGGADPPTQPDPKDSC5CLTAAEVHPAGRYVLC5PSTTP	
		SPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
SEQ ID NO:131	AXL de <i>Mus musculus</i>		

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
		<p>MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAA HKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCELQVQGE PPEVVWLRDQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVV SQLRISALQLSDAGEYQCMVHLEGRTFVSQPGFVGLEG LPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLWLQ DAVPLAPVTGHSSQHSQTPLNKTSSFSCEAHNAKGV TTSRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTLEVAWTPGLSGI YPLTHCNLQAVLSDDGVIWLGKSDPPEDPLTLQVSVP PHQLRLEKLLPHTPYHIRISCSQSPWTHWLPVETTE GVPLGPPENVSAMRNGSQVLRVWQEPVPLQGTLLGY RLAYRGQDTPEVLMIDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSV TAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPGQGPLHHLVSEPPP RAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRY GEVFPTVERGELVVRVVRKYSRRTTEATLNSLGISEEL KEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQD DSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNV MRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRL GDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAA RNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMP VKWIAIESLADRVTYSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPY PGVENSEIYDLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWEL NPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILYVNMDEG GGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAG RYVLCSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA</p>	
SEQ ID NO:132	AXL de <i>Homo sapiens</i> - dominio Ig1 de <i>Mus musculus</i>	<p>MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAQEEES PFVGNPGNITGARGLTGTLRCLQVQGEPPVHWLRD GQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSD TGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDKAV PANTPFNLSCQAQGPPEPVTLWLQDAVPLAPVTGHSS QHSQTPLNKTSSFSCEAHNAKGVTTTSRTATITVLPQQ PRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSD DGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLHPHTP YHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISAT RNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGGQDTPEVL MDIGLRQEVTLLELQGDGVSNTVCVAAYTAAGDGPW</p>	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
		SLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYV LLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFPTVERGE LVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDR HKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDS ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMR LIGVCFQGSERESFPAPVILPFMKHGDLSFLLYSRLGD QPVYLPQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARN CMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVK WIAIESLADRVTYSKSDVVSFGVTMWEIATRQTPYPG VENSEIYDLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNP QDRPSFTELREDLNTLALPPAQEPDEILYVNMDEGG GYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRY VLCPSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
SEQ ID NO:133	AXL de <i>Homo sapiens</i> - dominio Ig2 de <i>Mus musculus</i>	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAQEEES PFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRD GQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSD TGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGLGLPYFLEEPEDKAV PANTPFNLSCQAQGPPEPVTLWLQDAVPLAPVTGHSS QHSLQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRATITVLPQQ PRNLHLVSRQPTLEVAVWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSD DGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTP YHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISAT RNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPPEVL MDIGLRQEVTLELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPW SLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYV LLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFPTVERGE LVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDR HKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDS ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMR LIGVCFQGSERESFPAPVILPFMKHGDLSFLLYSRLGD QPVYLPQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARN CMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVK WIAIESLADRVTYSKSDVVSFGVTMWEIATRQTPYPG VENSEIYDLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNP QDRPSFTELREDLNTLALPPAQEPDEILYVNMDEGG GYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRY	
		VLCPSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:134	AXL de <i>Homo sapiens</i> - dominio FN1 de <i>Mus musculus</i>	<p>MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEES PFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRD GQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSD TGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVVGLEGLPYFLEEPEDRTV AANTPFNLSCQAQGPPEVDLLWLQDAVPLATAPGHG PQRSLHVPGLNKTSSFCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQ RPHHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNLQAVLS DDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTP YHIRISCSQSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENISAT RNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVL MDIGLRQEVTLQGDGVSNTVCVAAYTAAGDGPW SLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYV LLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFPTVERGE LVVRYRVRKYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDR HKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDS ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMR LIGVCFQGSERESFPAPVILPFMKHGDLSFLLYSRLGD QPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARN CMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVK WIAIESLADRVTYSKSDVWSFGVTMWEIATRGTQTPYPG VENSEIYDLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNP QDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILYVNMDEGG GYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRY VLC PSTTSPAQPADRGSPAAPGQEDGA</p>	
SEQ ID NO:135	AXL de <i>Homo sapiens</i> - dominio FN2 de <i>Mus musculus</i>	<p>MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEES PFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRD GQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSD TGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVVGLEGLPYFLEEPEDRTV AANTPFNLSCQAQGPPEVDLLWLQDAVPLATAPGHG PQRSLHVPGLNKTSSFCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQ QPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLS DDGMGIQAGEPDPPEELTSQASVPPHQLRGLSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENVS AMRNGSQVLVRWQEPVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPE VLMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGP</p>	

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
		<p>WSLPVPLEPWRPGQGQPLHHLVSEPPPRAFSWPWWY VLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERG ELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVD RHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSSILKVAVKTM KIAICTRSELEDLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGS ERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLYSRLGDQPVYLPTQ MLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENM SVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLAD RVYTSKSDVVSFGVTMWEIATRGTYPYGVENSEIYDY LRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTE LREDLENTLKAAPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGA AGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSTTP SPAQPADRGSPAAPGQEDGA</p>	
SEQ ID NO:136	VH 511	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS<u>GFTFSSY</u>AMNWW RQAPGKGLEWVSGISGSGGHTYHADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<u>AKDRYDILTGYYNLLDY</u> WGQGLTVTVSS</p>	Ab que se une al dominio Ig2
SEQ ID NO:137	CDR1 de VH 511	GFTFSSYA	
SEQ ID NO:138	CDR2 de VH 511	ISGSGGHT	
SEQ ID NO:139	CDR3 de VH 511	AKDRYDILTGYYNLLDY	
SEQ ID NO:140	VL 511	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS<u>QGISSW</u>LAWYQQ KPEEAPKSLIY<u>AAS</u>LSQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQ PEDFATYYC<u>QQYNSYPLT</u>FGGGAKVEIK</p>	
SEQ ID NO:141	CDR1 de VL 511	QGISSW	
	CDR2 de VL 511	AAS	
SEQ ID NO:142	CDR3 de VL 511	QQYNSYPLT	
SEQ ID NO:143	VH 061	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYAFTGYGISWVR QAPGQGLEWIGWISAYNGNTNYVQNLQDRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDHISMLRGIIRNYW GQGLTVTVSS</p>	Ab que se une al dominio Ig1

ES 2 774 428 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
SEQ ID NO:144	VL 061	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPE DFAVYYCQQRSSWPRLTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO:145	VH 137	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSRYAISWVR QAPGQGLEWMGRIPIVGIANYAQKFQGRVTLTADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAGYSSSWYAEYFQHW	
		GQGTLVTVSS	
SEQ ID NO:146	VL 137	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGFPDRFSGSGSGTDFLTISR L EPEDFAVYYCQYQYSSPYTFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO:147	AXL de <i>Mono Cynomolgus</i> (número GenBank HB387229.1)	AWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTAEEESP FVGNP GNITGARGLTGLRCQLVQGEPPVHWRD G QILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRIASLQ LSDA GQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLLEPLPYFLEEP EDRTV AANTPFNLSCQAQGPPEVDLLWLQDAVPLATAP GHG PQRNLHVPGLNKTSSFCEAHNAKGVTTSRATITV LPQ QPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCT LQAVLS DDGMGIQAGEPDPPEEPLTQASVPPHQLRLGSL HPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPP ENISA TRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQD TPEV LMDIGLRQEVTLELQGDGVSNTVCVAAYTAAGD GP WSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKETSAPAFSWP WWW YILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEV FEPTVER GELVVRVYRVRKYSRRTTEATLNSLGISEELKE KLRDVMV DRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQD DSILK VAVKT MKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLI GVCFQG SERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLYSRLGDQP VYLP TQ MLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCML NENM SVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAI ESLAD RVYTSKSDVVSFGVTMWEIATRGQTPYPGVEN SEIYDY LRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDR PSFTE LREDLENTL KALPPAQEPDEILYVNMDEGGGY PEPPGA AGGADPPTQLDPK DSCSCLTSAEVHPAGRYV LCPSTAPS PAQPADRGSPAAPGQEDGA	

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como límites adicionales.

Ejemplos

5

Ejemplo 1 - Inmunización y generación de anticuerpos contra AXL

Construcciones de expresión para AXL

10 Se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para la expresión de diversas variantes de AXL completas: AXL humana (*Homo sapiens*) (número de acceso de Genbank NP_068713.2), AXL quimérica de ser humano-mono cinomolgo en la que el dominio extracelular humano (ECD) fue reemplazado por el ECD de AXL de mono cinomolgo (*Macaca fascicular*) (traducción del acceso de Genbank HB387229.1; aa 1-447), AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el ECD humano se reemplazó por la ECD de AXL de ratón (*Mus musculus*) (acceso de Genbank NP_033491.2; aa 1-441), AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio I de tipo Ig humano (aa 1-134, también denominado "dominio Ig1" en la presente memoria) se reemplazó por el dominio I de tipo Ig de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio II de tipo Ig (aa 148-194, también denominado "dominio Ig2" en la presente memoria) se reemplazó por el dominio II de tipo Ig de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio I de tipo FNIII humano (aa 227-329, también denominado "dominio FN1" en la presente memoria) se reemplazó por el dominio I de tipo FNIII de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio II de tipo FNIII humano (aa 340-444, también denominado "dominio FN2" en la presente memoria) se reemplazó por el dominio II de tipo FNIII de AXL de ratón. Además, se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para diversas variantes de ECD de AXL: el dominio extracelular (ECD) de AXL humana (aa 1-447) con una etiqueta His C-terminal (AXLECDHis), el dominio II de tipo FNIII de AXL humana (aa 327-447) con un péptido señal N-terminal y una etiqueta His C-terminal (AXL-FN2ECDHis), y los dominios de tipo Ig1 y de tipo Ig2 de AXL humana (aa 1-227) con una etiqueta His C-terminal (AXL-Ig12ECDHis).

Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia óptima de Kozak (GCCGCCACC) [141]. Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.3 (Invitrogen).

30

Expresión de AXL en células EL4

Las células EL4 se transfectaron de manera estable con el vector pcDNA3.3 que contenía la secuencia codificante de AXL humana completa y los clones estables se seleccionaron después de la selección con el agente antibiótico, G418, (Geneticina).

35

Purificación de AXL con etiqueta His

40 Se expresaron AXLECDHis, AXL-FN2ECDHis y AXL-Ig12ECDHis en células HEK-293F. La etiqueta His permite la purificación con cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. En este proceso, un quelante fijado sobre la resina cromatográfica se carga con cationes Co^{2+} . Los sobrenadantes que contenían proteína etiquetada con His se incubaron con la resina en modo discontinuo (es decir, solución). La proteína etiquetada con His se une fuertemente a las esferas de resina, mientras que otras proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo no se unen o se unen débilmente en comparación con las proteínas etiquetadas con His. Después de la incubación, las esferas se recuperan del sobrenadante y se empaquetan en una columna. La columna se lava para eliminar las proteínas débilmente unidas. Las proteínas etiquetadas con His fuertemente unidas se eluyen con un tampón que contiene imidazol, que compite con la unión de His a Co^{2+} . El eluyente se elimina de la proteína mediante intercambio de tampón en una columna de desalinización.

50

Inmunización

Los anticuerpos IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-613 e IgG1-AXL-726 se obtuvieron de las siguientes inmunizaciones: se inmunizaron ratones transgénicos para HCo12-BalbC (IgG1-AXL-107), HCo17-BalbC (IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-726) y HCo20 (IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-613) (Medarex, San José, CA, EE.UU.) de forma alterna por vía intraperitoneal (IP) con 20 μg de la proteína AXLECDHis (IgG1-AXL-511, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-183), 20 μg de AXL-FN2ECDHIS más 20 μg de AXL-Ig12ECDHis (IgG1-AXL-726) o 20 μg de AXL-Ig12ECDHis (IgG1-AXL-107) y por vía subcutánea (SC; en la base de la cola) con la misma proteína, con un intervalo de 14 días. En total se realizaron 8 inmunizaciones: 4 inmunizaciones IP y 4 SC. Para la mayoría de las inmunizaciones, la primera inmunización se realizó en coadyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.) y todas las inmunizaciones posteriores en coadyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.). El anticuerpo IgG1-AXL-183 se obtuvo de inmunizaciones que se realizaron todas en el sistema coadyuvante Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

60

Los anticuerpos IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-171 e IgG1-AXL-733 se obtuvieron de las siguientes inmunizaciones: se inmunizaron ratones transgénicos para HCo12-BalbC (IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148), HCo17-BalbC (IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-733), y HCo20-BalbC (IgG1-AXL-171) (Medarex, San José, CA, EE. UU.) con 20 µg de la proteína AXLECDHis en CFA. Posteriormente, se inmunizaron ratones alternando intraperitonealmente (IP) con células EL4 transfectadas con AXL humana completa en PBS y subcutáneamente (SC; en la base de la cola) con la proteína AXLECDHis en IFA, con un intervalo de 14 días.

Los ratones con al menos dos títulos de anticuerpos específicos de AXL secuenciales de 200 (diluciones séricas de 1/200) o más, detectados en el ensayo FMAT de escrutinio específico de antígeno como se describe a continuación, se reforzaron 3-4 días antes de la fusión (10 µg de proteína derivada de AXL en PBS inyectados por vía intravenosa).

Ensayo de escrutinio específico de antígeno homogéneo

La presencia de anticuerpos anti-AXL en sueros de ratones inmunizados o sobrenadante de cultivo de transfectoma o hibridoma HuMab (anticuerpo monoclonal humano) se determinó mediante ensayos de escrutinio específicos de antígeno homogéneo utilizando Tecnología de Ensayo Fluorométrico en Microvolúmenes (FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Para esto, se utilizaron dos diseños de prueba diferentes con combinaciones de ensayos basados en 4 u 8 células.

El diseño de prueba de ensayo basado en 4 células se utilizó para la prueba de sueros de ratones inmunizados y como prueba de escrutinio primario para el sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma. En el diseño de la prueba de 4 ensayos, se analizaron muestras para determinar la unión de anticuerpos humanos a células A431 (DSMZ) y MDA-MB-231 (ambas expresan AXL en la superficie celular), así como la unión a TH1021-AXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente AXL humana completa; producida como se ha descrito anteriormente) y células HEK293 de tipo salvaje (control negativo que no expresa AXL), respectivamente.

Las muestras de sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma se sometieron adicionalmente a un diseño de prueba de ensayo basado en 8 células. En el diseño de la prueba de 8 ensayos, se analizaron muestras para determinar la unión de anticuerpos humanos a células TH1021-hAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana), TH1021-cAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de ser humano-cinomolgo en las que el ECD humano había sido reemplazado por el ECD de AXL de mono cinomolgo), TH1021-mAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de ser humano-ratón en las que el ECD humano había sido reemplazado por el ECD de AXL de ratón), TH1021-mIg1 (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana estando el dominio I de tipo Ig reemplazado por el dominio I de tipo Ig de AXL de ratón), TH1021-mIg2 (células HEK-293F que expresan transitoriamente AXL humana estando el dominio II de tipo Ig reemplazado por el dominio II de tipo Ig de AXL de ratón), TH1021-mFN1 (células HEK-293F que expresan transitoriamente AXL humana estando el dominio I de tipo FNIII reemplazado por el dominio I de tipo FNIII de AXL de ratón), TH1021-mFN2 (HEK-293F células que expresan transitoriamente AXL humana estando el dominio II de tipo FNIII reemplazado por el dominio II de tipo FNIII de AXL de ratón) y HEK293 de tipo salvaje (control negativo que no expresa AXL), respectivamente.

Se añadieron muestras a las células para permitir la unión a AXL. Posteriormente, se detectó la unión de HuMab utilizando un producto conjugado fluorescente (Anti-Fc gamma de IgG Humano de Cabra-DyLight649; Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo de ratón humanizado específico de AXL A0704P (producido en células HEK-293F) se utilizó como control positivo y el suero reunido de ratón HuMab y la IgG humana ChromPure, molécula completa (Jackson ImmunoResearch), respectivamente, se utilizaron como controles negativos. Las muestras se escanearon utilizando un Sistema de Detección Celular 8200 de Applied Biosystems (8200 CDS) y se utilizó fluorescencia media como lectura. Las muestras se declararon positivas cuando los recuentos fueron superiores a 50 y los recuentos x fluorescencia fueron al menos tres veces más altos que el control negativo.

Generación de hibridoma HuMab

El ratón HuMab con suficiente desarrollo de título específico de antígeno (descrito anteriormente) se sacrificó y se recogieron el bazo y los ganglios linfáticos que flanqueaban la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de esplenocitos y células de ganglios linfáticos a una línea celular de mieloma de ratón (células SP2.0) se realizó por electrofusión utilizando un Sistema de Electrofusión CytoPulse CEEF 50 (Collectis, París, Francia), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, los pocillos primarios se subclonaron utilizando el sistema ClonePix (Genetix, Hampshire, Reino Unido). Con este fin, se sembraron hibridomas de pocillos primarios específicos en medio semisólido elaborado a partir de CloneMedia al 40% (Genetix, Hampshire, Reino Unido) y medios completos HyQ 2x al 60% (Hyclone, Waltham, EE.UU.). Los subclones se volvieron a someter a prueba de acuerdo con el ensayo de unión específico del antígeno como se describió anteriormente y se exploraron utilizando el sistema IsoCyte (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). Los niveles de IgG se midieron utilizando un Octet (Fortebio, Menlo Park, EE.UU.) para seleccionar el mejor clon productor por pocillo primario para una mayor

expansión. La expansión adicional y el cultivo de los hibridomas HuMab resultantes se realizaron basándose en protocolos convencionales (p. ej., como describen Coligan J.E., Brierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y Strober, W., eds. en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., 2006). Los clones derivados de este procedimiento se denominaron PC1021.

5

Espectrometría de masas de anticuerpos purificados

Se purificaron pequeñas alícuotas de 0,8 mL de sobrenadante de hibridoma que contenía anticuerpo a partir de 6 pocillos o de la fase Hyperflask utilizando columnas PhyTip que contenían resina de Proteína G (PhyNexus Inc., San José, EE.UU.) en una estación de trabajo Sciclone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, EE.UU.). Las columnas PhyTip se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero los tampones se reemplazaron por: Tampón de Unión PBS (B. Braun, Medical BV, Oss, Países Bajos) y Tampón de Elución 0,1 M Glicina-HCl pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemania). Después de la purificación, las muestras se neutralizaron con Tris-HCl 2 M pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Alternativamente, en algunos casos, se purificaron volúmenes mayores de sobrenadante de cultivo utilizando cromatografía en columna de afinidad con Proteína A.

Después de la purificación, las muestras se colocaron en una placa de 384 pocillos (Waters, placa de 100 µl de pocillos cuadrados, parte núm. 186002631). Las muestras se desglucosilaron durante la noche a 37°C con N-glucosidasa F. Se añadió DTT (15 mg/ml) (1 µl/pocillo) y se incubó durante 1 h a 37°C. Se desalinizaron las muestras (5 o 6 µl) en un Acquity UPLC™ (Waters, Milford, EE.UU.) con una columna BEH300 C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm a 60°C. Se utilizaron agua MQ y acetonitrilo de calidad LC-MS (Biosolve, núm. de cat. 01204101, Valkenswaard, Países Bajos) con ácido fórmico al 0,1% (Fluka, núm. de cat. 56302, Buchs, Alemania), como Eluyente A y B, respectivamente. Los espectros de masas de ionización por electronebulización de tiempo de vuelo se registraron en línea en un espectrómetro de masas micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Alemania) que funciona en el modo de iones positivos. Antes del análisis, se calibró una escala de 900-3000 m/z con mezcla de sintonización ES (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.). Los espectros de masas se desconvolucionaron con el soporte lógico DataAnalysis™ v. 3.4 (Bruker) utilizando el algoritmo de Máxima Entropía que busca pesos moleculares entre 5 y 80 kDa.

Después de la desconvolución, se compararon las masas de cadena pesada y ligera resultantes (en condiciones reductoras) para todas las muestras para encontrar anticuerpos duplicados. En la comparación de las cadenas pesadas se tuvo en cuenta la posible presencia de variantes de lisina C-terminal. Esto dio como resultado una lista de anticuerpos únicos, donde único se define como una combinación única de cadenas pesadas y ligeras. En caso de que se encontraran anticuerpos duplicados, se utilizaron los resultados de otras pruebas para decidir qué anticuerpo era el mejor material para continuar los experimentos.

35

Análisis de secuencia de los dominios variables del anticuerpo contra AXL y clonación en vectores de expresión

El ARN total se preparó de 0,2 a 5x10⁶ células de hibridoma y ADN Complementario 5'-RACE (ADNc) a partir de 100 ng de ARN total, utilizando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las regiones codificantes de VH y VL se amplificaron por PCR y se clonaron directamente, en marco, en los vectores de expresión pGlf y pKappa, por clonación independiente de la ligación (Aslanidis, C. y P.J. de Jong, *Nucleic Acids Res* 1990; 18(20): 6069-74). Para cada anticuerpo, se secuenciaron 12 clones VL y 12 clones VH. Las secuencias resultantes se muestran en la Tabla 1. Las secuencias de las CDR se definieron de acuerdo con IMGT [22] y [23]. Se seleccionaron los clones con un Marco de Lectura Abierto (ORF) correcto para su posterior estudio y expresión. Los vectores de todas las combinaciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras que se encontraron se co-expresaron transitoriamente en células Freestyle™ 293-F utilizando 293fectina.

50

Para los anticuerpos IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-726, se generaron las siguientes variantes con mutaciones puntuales en los dominios variables: IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-183-N52Q e IgG1 -AXL-726-M101L. Los mutantes se generaron por mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit de mutagénesis Quickchange II (Stratagene).

55

Anticuerpos de control de AXL

En algunos de los Ejemplos se utilizó un anticuerpo de comparación contra AXL (IgG1-YW327.6S2) que se ha descrito previamente [142] y [143]. Las secuencias de VH y VL para estos anticuerpos específicos de AXL se clonaron en los vectores de expresión pGlf y pKappa.

60

Anticuerpo b12

En algunos de los ejemplos, se utilizó el anticuerpo b12, un anticuerpo específico de gp120 [144] como control negativo.

Expresión

Los anticuerpos se expresaron como IgG1, κ . Las mezclas de ADN plasmídico que codificaban las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos se transfectoron transitoriamente a células HEK293F Freestyle (Invitrogen, EE.UU.) utilizando 293fectina (Invitrogen, EE.UU.) esencialmente como describe el fabricante.

Purificación de anticuerpos

El sobrenadante de cultivo se filtró sobre filtros sin salida de 0,2 μ m, se cargó sobre columnas MabSelect SuRe de 5 mL (GE Health Care) y se hizo eluir con citrato de sodio-NaOH 0,1 M, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2M, pH 9 y se sometió a diálisis durante la noche frente a NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Alternativamente, después de la purificación, el eluato se cargó sobre una Columna de Desalinización HiPrep y el anticuerpo se intercambió en tampón de NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Después de la diálisis o el intercambio de tampón, las muestras se filtraron en condiciones estériles sobre filtros sin salida de 0,2 μ m. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración de IgG se midió utilizando Octet (Fortebio, Menlo Park, EE.UU.). Los anticuerpos purificados se almacenaron a 4°C.

El anticuerpo IgG1-AXL-511 se generó mediante el siguiente método:

Construcciones de expresión para AXL

Se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para la expresión de varias variantes de AXL completas: AXL humana (*Homo sapiens*) (número de acceso de Genbank NP_068713.2), AXL quimérica de ser humano-mono cinomolgo en la que el dominio extracelular humano (ECD) fue reemplazado por el ECD de AXL de mono cinomolgo (*Macaca fascicular*) AXL (traducción del acceso de Genbank HB387229.1; aa 1-447), AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el ECD humano fue reemplazado por el ECD de AXL de ratón (*Mus musculus*) (acceso de Genbank NP_033491.2; aa 1-441), AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio I de tipo Ig humana (aa 1-147, también denominado "dominio Ig1" en la presente memoria) fue reemplazado por el dominio I de tipo Ig de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio II de tipo Ig humana (aa 148-227, también denominado "dominio Ig2" en la presente memoria) fue reemplazado por el dominio II de tipo Ig de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio I de tipo FNIII humano (aa 228-326, también denominado "dominio FN1" en la presente memoria) fue reemplazado por el dominio I de tipo FNIII de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio II de tipo FNIII (aa 327-447, también denominado "dominio FN2" en la presente memoria) fue reemplazado por el dominio II de tipo FNIII de AXL de ratón. Además, se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para diversas variantes de ECD de AXL: el dominio extracelular (ECD) de AXL humana (aa 1-447) con una etiqueta His C-terminal (AXLECDHis), el dominio II de tipo FNIII de AXL humana (aa 327-447) con un péptido señal N-terminal y una etiqueta His C-terminal (AXL-FN2ECDHis), y los dominios de tipo Ig1 e Ig2 de AXL humana (aa 1-227) con una etiqueta His C-terminal (AXL-Ig12ECDHis).

Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia óptima de Kozak (GCCGCCACC) (Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.3 (Invitrogen).

Expresión de AXL en células EL4

Las células EL4 se transfectoron de manera estable con el vector pcDNA3.3 que contenía la secuencia codificante de AXL humana completa y se seleccionaron los clones estables después de la selección con el agente antibiótico, G418, (Geneticina).

Purificación de AXL etiquetada con His

Se expresaron AXLECDHis, AXL-FN2ECDHis y AXL-Ig12ECDHis en células HEK293F y se purificaron con cromatografía de afinidad con metal inmovilizado.

Inmunización

Se utilizó material de 4 ratones transgénicos que expresaban secuencias de genes de anticuerpos humanos para seleccionar anticuerpos. Se eligieron los ratones inmunizados con diversos protocolos de inmunización y con diversas respuestas de anticuerpos y que producían diversos números de anticuerpos a partir del proceso de hibridoma tradicional. El ratón A (3,5% de aciertos en el proceso de hibridoma) fue un ratón transgénico HCo17-BALB/c (Bristol-Myers Squibb, Redwood City, CA, EE.UU.) se inmunizó alternativamente por vía intraperitoneal (IP) con 20 μ g de AXL-FN2ECDHIS más 20 μ g de AXL-Ig12ECDHis) y por vía subcutánea (SC) en la base de la cola con la misma proteína, con un intervalo de 14 días. En total se realizaron 8 inmunizaciones: 4 inmunizaciones IP y 4

SC. Para la mayoría de las inmunizaciones, la primera inmunización se realizó en coadyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.) y todas las inmunizaciones posteriores en coadyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.). El ratón B (0% de aciertos en el proceso de hibridoma) fue un ratón transgénico HCo12 (Medarex) inmunizado con 20 µg de la proteína AXLECDHis utilizando un protocolo de inmunización similar al del ratón A. El ratón C (38% de aciertos en el proceso de hibridoma) fue un ratón HCo12-BALB/c inmunizado alternando la vía intraperitoneal (IP) con células EL4 transfectadas con AXL humana completa en PBS y la vía subcutánea (SC; en la base de la cola) con la proteína AXLECDHis en IFA, con un intervalo de 14 días. El ratón D (0% de aciertos en el proceso de hibridoma) fue un ratón transgénico HCo12 (Medarex) inmunizado con 20 µg de la proteína AXL-Ig12ECDHis utilizando un protocolo de inmunización similar al del ratón A.

Los ratones con al menos dos títulos de anticuerpos específicos para AXL secuenciales de 200 (diluciones séricas de 1/200) o más, se reforzaron 3-4 días antes de la fusión (10 µg de proteína derivada de AXL en PBS inyectada por vía intravenosa).

Aislamiento de ARN de células de bazo

El ARN total se aisló de las células del bazo utilizando el kit Mini RNA easy (Qiagen). Se sintetizó el ADNc de la primera hebra para 5'-RACE utilizando 150 ng de ARN empleando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.), Transcriptasa Inversa PrimeScript (Clontech) y SMART IIA oligo y oligodT como cebadores. Las regiones codificantes de VL se amplificaron por PCR utilizando la polimerasa Advantage 2 (Clontech), los cebadores RACEkLIC4shortFW2 (320 nM), RACEkLIC4LongFW2 (80 nM) y RACEkLICRV_PmIA3 (400 nM), realizando 35 ciclos de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 68°C. Las regiones codificantes de VH se amplificaron por PCR utilizando ADN polimerasa Pfu Ultra II Fusion HS (Stratagene), los cebadores RACEG1LIC3shortFW (320 nM), RACEG1LIC3longFW (80 nM) y RACEG1LIC3RV2 (400 nM), realizando 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 66°C y 30 segundos a 72°C, terminando con una etapa de extensión final de 3 minutos a 72°C. Los productos de PCR que codificaban VH o VL se separaron utilizando electroforesis en gel de agarosa y los productos de ADN del tamaño esperado se cortaron del gel y se purificaron utilizando el kit Qiagen MiniElute. Las regiones codificantes de VH y VL amplificadas por PCR se clonaron, en marco, en los vectores de expresión de mamíferos pGlf (que contenía la secuencia de ADN que codificaba la región constante de IgG1 humana) para la región VH y pKappa (que contenía la secuencia de ADN que codificaba la región constante de la cadena ligera kappa) para la región VL, por medio de clonación independiente de la clonación (Aslanidis, C. y P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990;18(20): 6069-74) en la cepa de E. coli DH5αT1R (Life Technologies), produciendo colonias bacterianas individuales que contenían cada una un solo vector de expresión de HC o LC.

Secuencias de cebadores

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
SMARTIIA	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
RACEkLIC4shortFW2	5'-ACGGACGGCAGGACCACT
RACEkLIC4LongFW2	5'-ACGGACGGCAGGACCACTAAGCAGTGGTATCAACGCAGA
RACEkLICRV_PmIA3	5'-CAGCAGGCACACCACTGAGGCAGTTCAGATTC
RACEG1LIC3shortFW	5'-ACGGACGGCAGGACCACT
RACEG1LIC3longFW	5'-ACGGACGGCAGGACCACTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
RACEG1LIC3RV2	5'-GGAGGAGGGCGCCAGTGGGAAGACCGA
CMV P f (RRA2)	5'-GCCAGATATACGCGTTGACA
TK pA r (RRA2)	5'-GATCTGCTATGGCAGGGCCT

PCR de LEE

Los elementos de expresión lineal (LEE) se produjeron amplificando el fragmento que contenía el promotor de CMV, las regiones que codificaban HC o LC y los elementos que contenían la señal de poli A de los plásmidos de expresión. Para esto, las regiones se amplificaron utilizando la ADN polimerasa Accuprime Taq (Life Technologies) y los cebadores CMVPf (Bsal)2 y TkpA(Bsal)r, realizando 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 2 (LC) o 3 minutos (HC) a 68°C, utilizando material de colonias de E. coli (cepa DH5α), que contenía los plásmidos, como molde de ADN.

Expresión transitoria en células HEK-293

Los anticuerpos se expresaron como IgG1, κ. Las mezclas de ADN plasmídico que codificaban cadenas tanto

pesadas como ligeras de los anticuerpos se transfectaron transitoriamente en células Freestyle 293-F (HEK293F) (Life technologies, EE.UU.) utilizando 293fectina (Life technologies) esencialmente como describen Vink, T. et al. (2014) ('A simple, robust and high efficient transient expression system for producing antibodies', Methods, 65 (1), 5-10).

Para la expresión los LEE de Ab, se mezclaron 1 µl de la mezcla de reacción de PCR de HC LEE, 1 µl de la mezcla de reacción de PCR de LC y 1 µl de una mezcla potenciadora de 30 ng/µl que contenía una mezcla de 3 plásmidos potenciadores de la expresión como describen Vink, T., et al. (2014), y se transfectaron en células HEK293F en un volumen total de 100 µl utilizando 293fectin como reactivo de transfección, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life technologies), utilizando placas de 96 pocillos como recipiente, esencialmente como se describió anteriormente.

ELISA de AXLECDHis

Las placas de ELISA (Greiner, Países Bajos) se recubrieron con 100 µl/pocillo de AXLECDHis de 0,5 µg/mL en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente (RT). La solución de recubrimiento se retiró y los pocillos se bloquearon añadiendo 150 µl de PBSTC (PBS que contenía tween-20 al 0,1% y suero de pollo al 2%) e incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (PBS que contenía tween-20 al 0,1%)/pocillo y se añadieron 100 µl de solución de prueba, seguido de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con 300 µl de PBST/pocillo, se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana de cabra acoplado con peroxidasa de rábano picante (diluida 1/3000) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con 300 µl de PBST/pocillo, se añadieron 100 µl de solución ABTS (1 mg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente hasta que se observó una señal suficiente y la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de solución de ácido oxálico al 2%. Se midieron placas de 96 pocillos en un lector de ELISA a 405 nm.

Escrutinio de diversidad

Las muestras se analizaron para determinar la unión de los anticuerpos a células TH1021-hAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente la AXL humana), TH1021-cAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de ser humano-cinomolgo en las que el ECD humano había sido reemplazado por el ECD de AXL de mono cinomolgo), TH1021-mAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de ser humano-ratón en las que el ECD humano había sido reemplazado por el ECD de AXL de ratón), TH1021-mlg1 (células HEK293F que expresan transitoriamente la AXL humana que tienen el dominio I de tipo Ig reemplazado por el dominio I de tipo Ig de AXL de ratón), TH1021-mlg2 (células HEK293F que expresan transitoriamente AXL humana que tienen el dominio II de tipo Ig reemplazado por el dominio II de tipo Ig de AXL de ratón), TH1021-mFN1 (células HEK293F que expresan transitoriamente AXL humana que tienen el dominio I de tipo FNIII reemplazado por el dominio I de tipo FNIII de AXL de ratón), TH1021-mFN2 (células HEK293F que expresan transitoriamente AXL humana que tienen el dominio II de tipo FNIII reemplazado por el dominio II de tipo FNIII de AXL de ratón) y células HEK293F (control negativo que no expresa AXL), respectivamente.

Se añadieron muestras de la expresión de LEE a las células para permitir la unión a las diversas construcciones de AXL. Posteriormente, se detectó la unión de los anticuerpos utilizando un producto conjugado fluorescente (anti-Fc gamma de IgG humana de cabra - DyLight649; Jackson ImmunoResearch). Las muestras se exploraron utilizando un Sistema de Detección Celular 8200 de Applied Biosystems (8200 CDS) y se utilizó la fluorescencia media como lectura. Las muestras se declararon positivas cuando los recuentos fueron superiores a 50 y los recuentos x fluorescencia fueron al menos tres veces más altos que el control negativo.

Provisión de reservas de HC y LC:

Para cada ratón, se escogieron el vector de expresión 352 HC que contenía colonias bacterianas y el vector de expresión 384 LC que contenía colonias bacterianas y se amplificaron por medio de PCR para LEE. Parte de la reacción de LEE fue secuenciada (AGOWA). El porcentaje de construcciones que contenían el inserto VH apropiado era diferente en gran medida entre los 4 ratones, el ratón A (50%), el ratón B (23%), el ratón C (90%) y el ratón D (14%) y se parecía a la variación de los éxitos en el proceso de hibridoma, véase más arriba. La diversidad de HC en los ratones con solo una cantidad limitada de insertos adecuados estaba dominada por un gran grupo de HC idénticas, 65/83 en el ratón B y 46/49 en el ratón D. Para el ratón B y D, se seleccionaron las HC únicas (9 para el ratón B, 4 para el ratón D). Para el ratón A y C no se realizó ninguna selección.

Co-transfección de HC con una reserva de LC

Los LEE que codificaban HC individuales se co-transfectaron con una reserva de 96 LEE que codificaban LC utilizando el protocolo de transfección de LEE.

Selección de HC de anticuerpos de unión a AXL

5 Para los ratones B y D, los sobrenadantes de las co-transfecciones de LEE de la HC única con las LC agrupadas se analizaron para determinar la unión a AXL de las mezclas de anticuerpos producidas por el ELISA para AXL. Siete de las 9 HC del ratón B dieron como resultado la unión de AXL y 4 de las 4 HC del ratón D dieron como resultado la unión de AXL.

10 Para los sobrenadantes de ratón A y C de las co-transfecciones LEE de la HC única con las LC agrupadas se analizó la unión a AXL de las mezclas de anticuerpos producidas por el escrutinio de diversidad. Este escrutinio permitió tanto la identificación de las HC que se unían a AXL como un mapeo del epítipo aproximado, al identificar la pérdida de unión de anticuerpos a variantes de AXL. Del ratón A, aproximadamente 40% de las HC se unieron a la AXL humana, la mayoría de las cuales perdieron la unión al dominio Ig1 o FNIII-2, cuando estos dominios fueron reemplazados por el equivalente del ratón. Del ratón C, aproximadamente 70% de las HC se unieron a la AXL humana, la mayoría de las cuales perdieron la unión al dominio Ig1 o Ig2, cuando estos dominios fueron reemplazados por el equivalente de ratón. Basándose en la unión determinada por el ELISA para AXL o el escrutinio de diversidad, la información de la secuencia de HC y la pérdida de unión a dominios AXL específicos en el escrutinio de diversidad, se seleccionó un total de 12 HC únicas para la determinación de la mejor LC.

Co-transfección de HC con LC individuales

20 Cada LEE de HC individual de las 12 HC seleccionadas únicas se co-transfectó con 96 LEE de LC individuales de la reserva de LC de los ratones correspondientes.

Selección de LC de anticuerpos de unión a AXL

25 Los sobrenadantes de la expresión de LEE de las combinaciones de HC/LC únicas se analizaron para determinar la unión a AXL del anticuerpo producido por el ELISA para AXL. Para cada HC se encontraron al menos 6 LC y se seleccionó una única LC como la mejor, según los resultados de ELISA y la información de la secuencia de LC. Se identificaron anticuerpos de unión a AXL de los 4 ratones, incluso los ratones que no resultaron satisfactorios en el proceso de hibridoma.

Afinidad de unión del anticuerpo 511

35 Se determinó la afinidad de un anticuerpo anti-AXL (clon 511).

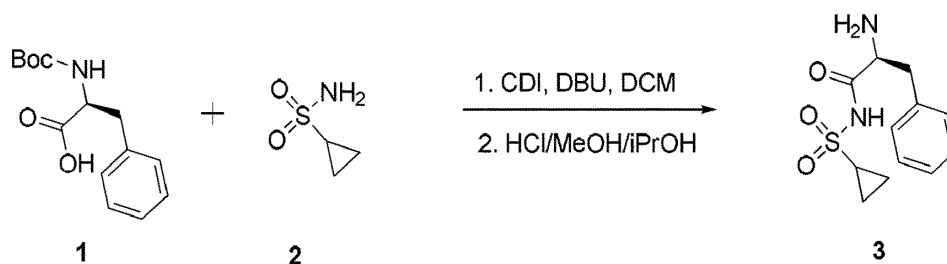
40 La afinidad se determinó utilizando la Interferometría de Biocapa en un ForteBio OctetRED384. Los biosensores de captura anti-Fc humano (AHC) (ForteBio, Portsmouth, Reino Unido; núm. de cat. 18-5064) se cargaron durante 150 s con hIgG (1 µg/mL) con el objetivo de una respuesta de carga 1 nm. Después del momento inicial (150 s), se determinaron la asociación (1000 s) y la disociación (2000 s) de AXLECDHis (como se describe en el Ejemplo 1), utilizando un intervalo de concentración de 10 µg/mL- 0,16 µg/mL (218 nM - 3 nM) con etapas de dilución 1:2. Para los cálculos, se utilizó la masa molecular teórica de AXLECDHis basada en la secuencia de aminoácidos, es decir, 46 kDa. Los experimentos se llevaron a cabo en un OctetRED384, mientras se agitaba a 1000 rpm y a 30°C. Cada anticuerpo se sometió a prueba en tres experimentos independientes.

45 Los datos se analizaron con el soporte lógico de análisis de datos ForteBio v7.0.3.1, utilizando el modelo 1:1 y un ajuste global completo con un tiempo de asociación de 1000 s y un tiempo de disociación de 1000 s a menos que se indique lo contrario. Se utilizó un tiempo de disociación de 1000 s (en lugar del tiempo de disociación de 2000 s que se había adquirido) ya que esto produjo mejores ajustes. Las trazas de datos se corrigieron restando una curva de referencia (anticuerpo sin AXLECDHis), el eje Y se alineó con los últimos 5 s del momento inicial, y se aplicó la corrección entre pasos y el filtrado Savitzky-Golay.

50 La afinidad (K_D) del clon 511 para AXL fue $23 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ (k_{on} $1,7 \cdot 10^5$ 1/Ms y una k_{dis} de $3,9 \cdot 10^{-3}$ 1/s)

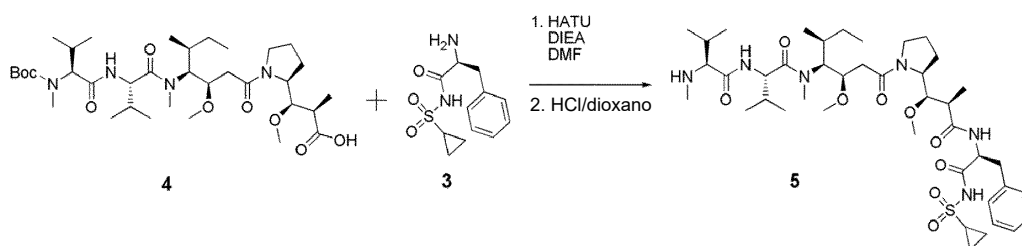
Síntesis de duostatina-3

55 **Preparación del compuesto 3:**



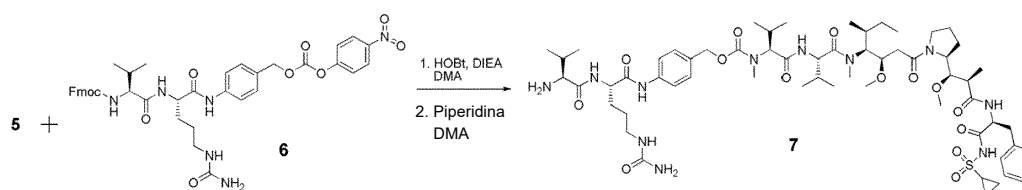
A una solución de Boc-L-fenilalanina **1** (5,36 g, 20,2 mmoles) en 30 mL de cloruro de metileno (DCM), se añadió carbonildiimidazol (CDI, 4,26 g, 26,3 mmoles) y se agitó durante 1 hora. A continuación, se añadió una solución de **2** (3,67 g, 30,3 mmoles) y ácido 2,4-diaminobutírico (DBU, 4,5 mL, 30 mmoles) en 15 mL de DCM. La mezcla se calentó a 40°C durante 16 horas. La mezcla se diluyó con 60 mL de DCM y 40 mL de agua, después se neutralizó a pH 7 con HCl concentrado. El extracto de DCM se recogió, se lavó con HCl 0,2 M (60 mL), después con salmuera (60 mL), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó para proporcionar 7,47 g de sulfonamida protegida con Boc. Este material se suspendió en 40 mL de metanol, después se añadieron 200 mL de HCl/isopropanol 6 N y la mezcla se agitó durante 2 horas. El disolvente se evaporó a vacío, después se añadieron 100 mL de éter. El producto precipitado se recogió por filtración y se secó para proporcionar el compuesto **3** en forma de sal de HCl (5,93 g, 96%); EM m/z 269,1 (M + H).

Preparación del compuesto 5:



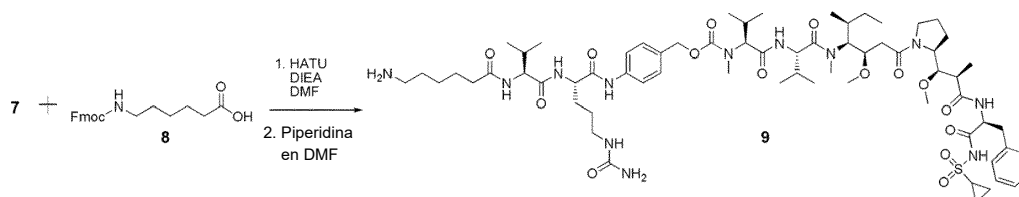
A una solución del compuesto **4** (1,09 g, 1,6 mmoles) en 10 mL de N,N-Dimetilformamida (DMF) se le añadió hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 0,61 g, 1,6 mmoles), diisopropiletilamina (DIEA, 0,56 mL) y compuesto **3** (0,49 g, 1,6 mmoles) en ese orden. La mezcla se agitó durante 1 hora y se diluyó con 100 mL de agua y 4 mL de ácido acético. El producto precipitado se recogió por filtración, se secó a vacío y se añadió a 10 mL de HCl/dioxano 4 M. Después de 30 minutos, se añadieron 200 mL de éter y se recogió el producto precipitado insoluble y se purificó por HPLC para proporcionar el compuesto **5** en forma de una sal de tetrahydrofurano (TFA, 1,3 g, 88%); MS m/z 835.5 (M + H). El compuesto **5** se denomina duostatina-3 en todo el manuscrito.

Preparación del compuesto 7:



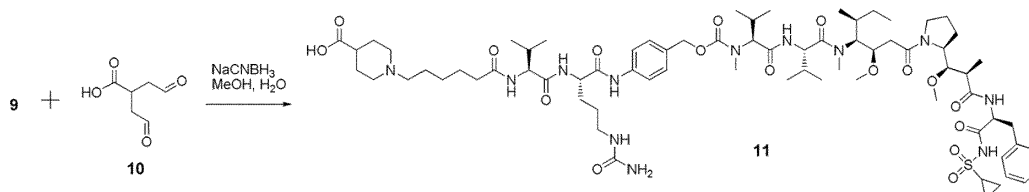
A una solución del compuesto **5** (500 mg, 0,527 mmoles) en 5 mL de DMF se le añadieron el compuesto **6** (483 mg, 0,631 mmoles), N-hidroxibenzotriazol (HOBt, 40 mg, 0,296 mmoles) y DIEA (0,27 mL). La mezcla se agitó durante 16 horas, después de lo cual se añadieron 0,4 mL de piperidina. Después de 1 hora, la mezcla se diluyó con 100 mL de éter y el producto precipitado se recogió y se secó para proporcionar el compuesto **7** en forma de una sal de HCl (640 mg, 95%); MS m/z 1240,7 (M + H).

Preparación del compuesto 9:



5 A una solución del compuesto 8 (219 mg, 0,62 mmoles) en 5 mL de DMF se le añadieron HATU (236 mg, 0,62 mmoles), DIEA (0,15 mL) y el compuesto 7 (316 mg, 1,6 mmoles), respectivamente. Después de 1 hora, se añadieron 0,2 mL de piperidina y la mezcla se agitó durante 30 minutos, después se purificó por HPLC para proporcionar el compuesto 9 en forma de una sal de TFA (235 mg, 64%); MS m/z 1353,8 (M + H).

Preparación del compuesto 11:



10
15 A una solución del compuesto 9 (235 mg, 0,16 mmoles) en 2 mL de metanol y 1 mL de agua se le añadió una solución de dialdehído 10 (1,6 mL de 0,3 M en iPrOH) y NaCNBH₃ (180 mg, 2,85 mmoles). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, y después se purificó por HPLC dando lugar al compuesto 11 en forma de una sal de TFA (126 mg, 50%); MS m/z 1465,8 (M + H)

Generación de productos conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) específicos de AXL

20 Los anticuerpos contra AXL purificados IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-726, así como el anticuerpo de control negativo IgG1-b12 fueron conjugados con Duostatina-3 por Concorthis Biosystems, Inc. (San Diego, CA) a través de covalente conjugación utilizando el conector K-lock AV1-valina-citrulina (vc) [58], [148] y [149].

25 Los productos conjugados de anticuerpo anti-AXL y fármaco se analizaron posteriormente para determinar la concentración (por absorbancia a 280 nm), la razón fármaco/anticuerpo ('DAR') por cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), la cantidad del fármaco no conjugado (por cromatografía de fase inversa), el porcentaje de agregación (por cromatografía de exclusión por tamaño, SEC-HPLC) y los niveles de endotoxina (por LAL). Los resultados fueron los siguientes (Tabla 2):

Tabla 2

	IgG1-AXL-148-vcDuostatina3	IgG1-AXL-183-vcDuostatina3	IgG1-AXL-726-vcDuostatina3	IgG1-b12-vcDuostatina3
Concentración (mg/mL)	6,57	3,40	5,93	3,36
DAR por HIC-HPLC	1,71	1,79	1,77	2,05
% de fármaco no conjugado	6,67	4,16	5,38	4,19
% agregado por SEC-HPLC	3,71%	3,35	3,42	1,75

Ejemplo 2 - Características de unión de los anticuerpos contra AXL

Afinidad de unión de los anticuerpos contra AXL

35 Se determinaron las afinidades del panel de 9 anticuerpos anti-AXL, así como 3 variantes de estos anticuerpos con mutaciones de aminoácidos individuales en los dominios variables (IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-183-N52Q, IgG1-AXL-726 -M101L).

40 Las afinidades se determinaron utilizando la Interferometría de Biocapa en un ForteBio OctetRED384. Los biosensores de captura anti-Fc humano (AHC) (ForteBio, Portsmouth, Reino Unido; núm. de cat. 18-5064) se

cargaron durante 150 s con hlgG (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con el objetivo de una respuesta de carga de 1 nm. Después de un momento inicial (150 s), se determinaron la asociación (1000 s) y la disociación (2000 s) de AXLECDHis (como se describe en el Ejemplo 1), utilizando un intervalo de concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 0,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (218 nM - 3 nM) con etapas de dilución 1:2. Para los cálculos, se utilizó la masa molecular teórica de AXLECDHis basada en la secuencia de aminoácidos, es decir, 46 kDa. Los experimentos se llevaron a cabo en un OctetRED384, mientras se agitaba a 1000 rpm y a 30°C. Cada anticuerpo se sometió a prueba en tres experimentos independientes.

Los datos se analizaron con el Soporte lógico de Análisis de Datos ForteBio v7.0.3.1, utilizando el modelo 1:1 y un ajuste global completo con 1000 s de tiempo de asociación y 1000 s de tiempo de disociación a menos que se indique lo contrario. Se utilizó un tiempo de disociación de 1000 s (en lugar del tiempo de disociación de 2000 s que se adquirió) ya que esto dio como resultado mejores ajustes. Para los anticuerpos IgG1-AXL-154 e IgG1-AXL-154-M103L se utilizó un tiempo de disociación de 500 s. Para IgG1-AXL-012 e IgG1-AXL-094 se utilizaron tiempos de disociación de 200 s. Las trazas de datos se corrigieron restando una curva de referencia (anticuerpo sin AXLECDHis), el eje Y se alineó con los últimos 5 s del momento inicial, y se aplicó la corrección entre etapas y el filtrado Savitzky-Golay.

Las afinidades (K_D) de los anticuerpos anti-AXL osciló entre $0,3 \cdot 10^{-9}\text{M}$ y $63 \cdot 10^{-9}\text{M}$ (tabla 3). Para el mutante IgG1-AXL-183-N52Q, la K_D fue menor que para el tipo salvaje IgG1-AXL-183, debido a una velocidad de disociación aproximadamente 2,5 veces mayor. La cinética observada de los otros dos mutantes fue similar a la cinética de las IgG de tipo salvaje.

Tabla 3

Anticuerpo	Afinidad de unión (OCTET)		
	KD (M)	Kon (1/ms)	Kdis (1/s)
IgG1-AXL-107	$16 \cdot 10^{-9}$	$2,8 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^{-3}$
IgG1-AXL-148	$20 \cdot 10^{-9}$	$2,3 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^{-3}$
IgG1-AXL-154	$7,2 \cdot 10^{-9}$	$2,6 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^{-3}$
IgG1-AXL-154-M103L	$7,8 \cdot 10^{-9}$	$2,7 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
IgG1-AXL-171	$17 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^{-3}$
IgG1-AXL-183	$10,2 \cdot 10^{-9}$	$4,1 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^{-4}$
IgG1-AXL-183-N52Q	$24 \cdot 10^{-9}$	$4,2 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
IgG1-AXL-613	$1,5 \cdot 10^{-9}$	$5,4 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^{-4}$
IgG1-AXL-726	$0,6 \cdot 10^{-9}$	$2,4 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^{-4}$
IgG1-AXL-726-M101L	$0,3 \cdot 10^{-9}$	$2,1 \cdot 10^5$	$6,9 \cdot 10^{-5}$
IgG1-AXL-733	$63 \cdot 10^{-9}$	$1,6 \cdot 10^5$	$9,7 \cdot 10^{-3}$

Unión de anticuerpos contra AXL a AXL humana, de ratón y de cinomolgo

Las células HEK293T se transfectaron transitoriamente con construcciones de expresión para AXL humana completa, AXL humana con un dominio extracelular (ECD) de mono cinomolgo o AXL humana con un ECD de ratón (véase el Ejemplo 1). La unión de los anticuerpos HuMab-AXL a estas células se evaluó mediante citometría de flujo. Las células HEK293 transfectadas se incubaron con diluciones en serie de anticuerpos contra AXL (intervalo de concentración final 0,0024-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, las células se incubaron con anti-F(ab')₂ de IgG de humana de cabra conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; núm. de cat. 109-116-098) diluido 1/100 en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% (volumen final 100 μL). A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, se resuspendieron en 120 μL de PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences).

Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

Figura 1A muestra que los anticuerpos HuMab-AXL mostraron una unión dependiente de la dosis a las células HEK293 que expresaban ECD de AXL humana. Además, los anticuerpos HuMab-AXL reconocieron AXL con un ECD de mono cinomolgo, con valores de CE_{50} en el mismo intervalo que para AXL completamente humana (**Figura 1B**) En contraste, la unión de los HuMab a AXL con un ECD de ratón fue baja (IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-733, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL -183-N52Q) o no detectable (IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-

613, IgG1-AXL-726, IgG1-AXL-726-M101L, IgG1-AXL-148; **Figura 1C**). Como se esperaba, el anticuerpo de control negativo IgG1-b12 no mostró (**Figura 1**) unión a las células que expresaban cualquiera de las variantes de AXL. La Tabla 4 muestra los valores de CE50 y las desviaciones típicas para la unión de los anticuerpos anti-AXL a AXL humana o AXL humana con un ECD de AXL de cinomolgo (determinados en al menos 3 experimentos). Los valores de CE50 para la unión a AXL humana con un ECD de AXL de ratón no se pudieron determinar a una unión muy baja o ausente.

Tabla 4

Anticuerpo	CE50 de unión (µg/mL)	
	Promedio (d.t.) de AXL humana	Promedio (d.t.) de AXL de cinomolgo
IgG1-AXL-107	0,050 (0,004)	0,149 (0,021)
IgG1-AXL-154	0,105 (0,003)	0,160 (0,027)
IgG1-AXL-154-M103L	0,110 (0,038)	0,161 (0,042)
IgG1-AXL-171	0,073 (0,023)	0,157 (0,057)
IgG1-AXL-613	0,040 (0,023)	0,146 (0,023)
IgG1-AXL-726	0,288 (0,206)	0,349 (0,160)
IgG1-AXL-726-M101L	0,184 (0,117)	0,250 (0,066)
IgG1-AXL-733	0,176 (0,094)	0,254 (0,114)
IgG1-AXL-148	0,094 (0,059)	0,152 (0,080)
IgG1-AXL-183	0,526 (0,177)	0,309 (0,086)
IgG1-AXL-183-N52Q	0,350 (0,206)	0,324 (0,121)

10 **Competición entre los anticuerpos contra AXL y Gas6 por la unión a AXL**

Se sometió a prueba si el ligando de AXL Gas6 interfería en la unión de los anticuerpos contra AXL a AXL. Por lo tanto, las células A431 positivas para AXL se incubaron durante 15 minutos a 4°C con 10 µg/mL de Gas6 humano recombinante (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido; Núm. cat. 885-GS). Con posterioridad, se prepararon diluciones en serie de anticuerpos contra AXL (intervalo de concentración final 0,014-10 µg/mL), se añadieron a las células y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, las células se incubaron en 100 µL con anticuerpo secundario a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. Como anticuerpo secundario que se une a la región Fc, se utilizó anti-F(ab')₂ de IgG humana de cabra conjugado con R-Ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; Núm. cat. 109-116-098) diluido 1/100 en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, se resuspendieron en 120 µL de PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences).

Alternativamente, las células A431 se preincubaron con 10 µg/mL de anticuerpos contra AXL (15 minutos, 4°C) para evaluar si el ligando de AXL Gas6 todavía podía unirse en presencia de anticuerpos contra AXL. Después de la incubación previa de anticuerpos, se añadieron a las células diluciones en serie de Gas6 humano recombinante (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido; Núm. cat. 885-GS) a concentraciones finales de 0,001-20 µg/mL y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, las células se incubaron con IgG2a anti-Gas6 de ratón (R&D Systems; núm. de cat. MAB885) a 4°C durante 30 min. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, las células se incubaron con anti-IgG de ratón de cabra marcado con FITC (Dako, Heverlee, Bélgica; núm. de cat. F049702) a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, se resuspendieron en 120 µL de PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences).

35 Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

En los experimentos (n = 3) en los que las células A431 se incubaron previamente con Gas6, los valores de unión máxima de los anticuerpos anti-AXL fueron comparables a la unión del anticuerpo en ausencia de Gas6 (la unión máxima después de la preincubación de Gas6 fue de 90-108% de unión sin preincubación con Gas6) (Tabla 4). Los valores de CE₅₀ para la unión del anticuerpo contra AXL con o sin preincubación con Gas6 estaban en el mismo intervalo, o algo incrementados después de la preincubación con Gas6 (Tabla 5).

La unión del anticuerpo contra AXL de control YW327.6S2 a las células A431 se redujo considerablemente en

presencia de Gas6 en comparación con la unión sin Gas6. La unión máxima de YW327.6S2 en presencia de Gas6 fue de 19% de la unión sin Gas6, y el valor de CE50 para la unión a las células A431 fue 21 veces mayor cuando las células se incubaron previamente con Gas6.

5 En experimentos en los que las células A431 se incubaron previamente con anticuerpos anti-AXL, se evaluó la unión a Gas6 (n = 3). La unión de Gas6 a las células A431 fue similar con o sin preincubación con anticuerpos HuMab-AXL. Las concentraciones de CE50 promedio de la unión de Gas6 cuando las células se incubaron previamente con los HuMab (0,34-0,83 µg/ml) y la unión máxima de Gas6 fueron similares a la unión de Gas6 en presencia de anticuerpo de control negativo b12 (concentración de CE50: 0,40 µg/ml; 95-115% de la unión de Gas6 en presencia del anticuerpo de control b12). La unión de Gas6 a las células A431 se redujo considerablemente en presencia del anticuerpo contra AXL de control YW327.6S2 en comparación con la preincubación con b12 (la concentración de CE50 fue 14 veces mayor). La unión máxima de Gas6 en presencia del anticuerpo control YW327.6S2 fue 17% de la unión en presencia del anticuerpo de control negativo b12.

15 Tabla 5

Anticuerpo	Unión del anticuerpo a las células A431			Unión de Gas6 a las células A431	
	CE50 sin Gas6 (µg/mL) media (d.t.)	CE50 en presencia de Gas6 (µg/mL) media (d.t.)	Unión máxima en presencia de Gas6 (% de unión en ausencia de Gas6) media (d.t.)	CE50 en presencia de anticuerpos contra AXL (µg/mL) media (d.t.)	Unión máxima en presencia de anticuerpos contra AXL (% de unión en presencia de anticuerpo de control) media (d.t.)
IgG1-AXL-107	0,16 (0,17)	0,94 (1,18)	91 (5)	0,78 (0,54)	96 (8)
IgG1-AXL-148	0,11 (0,13)	0,20 (0,30)	93 (5)	0,73 (0,52)	106 (7)
IgG1-AXL-154	0,42 (0,55)	0,76 (0,78)	99 (13)	0,44 (0,28)	95 (10)
IgG1-AXL-171	0,18 (0,21)	0,32 (0,40)	95 (5)	0,69 (0,42)	108 (5)
IgG1-AXL-183	0,69 (0,72)	1,19 (1,11)	90 (19)	0,34 (0,13)	115 (8)
IgG1-AXL-511	0,12 (0,11)	0,30 (0,31)	93 (15)	0,74 (0,44)	113 (6)
IgG1-AXL-613	0,09 (0,09)	0,10 (0,10)	108 (22)	0,57 (0,36)	100 (11)
IgG1-AXL-726	0,32 (0,35)	0,55 (0,69)	97 (10)	0,77 (0,58)	98(10)
IgG1-AXL-733	0,49 (0,51)	0,62 (0,23)	93 (5)	0,83 (0,54)	96 (5)
YW327.6S2	0,09 (0,09)	1,90 (1,04)*	41 (24)	5,53 (7,09)*	17 (10)
b12	n/a ^a	n/a	n/a	0,40(0,11)	100

^a n.a., no aplicable
* Valores de CE50 menos precisos debido a la baja unión

Ejemplo 3 - Estudio de mapeo epitópico en un panel de anticuerpos anti-AXL

20 **Determinación de la especificidad del dominio AXL utilizando moléculas quiméricas de AXL de ser humano-ratón**

La especificidad del dominio AXL de los anticuerpos contra AXL se determinó utilizando un panel de mutantes AXL quiméricos de ser-humano ratón. Se generaron cinco moléculas de AXL quiméricas diferentes, en las cuales el dominio I de tipo Ig humano (Ig1), el dominio II de tipo Ig (Ig2), el dominio I de tipo FNIII humano (FN1) o el dominio II de tipo FNIII humano (FN2) fueron reemplazados por sus homólogos murinos.

Las siguientes construcciones con codones optimizado para la expresión de las quimeras de AXL de ser humano-
ratón se generaron y expresaron en células HEK293F como se describe en el Ejemplo 1:

AXL de Homo sapiens (p33-HAHs-AXL): (SEQ ID NO: 130)

5

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAPRGTAQAEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGQPSRSLHVPGLNKTSFSCEAHNAKGVTTSRRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSNDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPVELMDIGLRQEVTLQDGDGVSNTVCAAYTAAGDGPWVSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSSWPWWYVLLGAVVAAACVLLALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVVSFGVTMWEIATRGTQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPDKDSCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

10

AXL de Mus musculus (p33-HAMm-AXL): (SEQ ID NO: 131)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAHKDQTEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQRISALQLSDAGEYQCMVHLEGRTFVSQPGFVLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSLSQTPGLNKTSFSCEAHNAKGVTTSRRTATITVLPQRPHHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTPYHIRISCSQSPSWTHWLPVETTEGVPLGPPENVSAMRNGSQVLRVWQEPVPLQGTLLGYRLAYRQDTPVELMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWVSLPVPLEPWRPGGQPLHLLVSEPPRAFSSWPWWYVLLGAVVAAACVLLALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVVSFGVTMWEIATRGTQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPDKDSCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

AXL de Homo sapiens - Dominio Ig1 de Mus musculus (p33-AXL-mlg1): (SEQ ID NO: 132)

MGRVPLAWLALCCWGCAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQRISALQLSDAGEYQCMVHLEGRTFVSQPGFVLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGQPSRSLHVPGLNKTSFSCEAHNAKGVTTSRRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPVELMDIGLRQEVTLQDGDGVSNTVCAAYTAAGDGPWVSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSSWPWWYVLLGAVVAAACVLLALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVVSFGVTMWEIATRGTQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPDKDSCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

15

AXL de Homo sapiens - Dominio de Ig2 de Mus musculus (p33-AXL-mlg2): (SEQ ID NO: 133)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAQAEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSLSQTPGLNKTSFSCEAHNAKGVTTSRRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPVELMDIGLRQEVTLQDGDGVSNTVCAAYTAAGDGPWVSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSSWPWWYVLLGAVVAAACVLLALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVVSFGVTMWEIATRGTQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNP

QDRPSFTELRELENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPDKDSCSCLTAAEVHPAGRYV
LCPSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

AXL de Homo sapiens - Dominio FN1 de Mus musculus (p33-AXL-mFN1): (SEQ ID NO: 134)
MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCLQVQGEPEVHWLRD
GQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLLEGLPYFLEEPEDRTV
AANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLDQAVPLATAPGHGPPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRATITVLPQR
PHHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTPY
HIRISCSSSQGSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPPEVLM
DIGLRQEVTELEQDGDGVSNTVCVAAYTAAGDGPWSLVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLL
GAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHK
VALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSDS
ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSHFLYSRLGD
QPVYLPQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVK
WIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLKQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNP
QDRPSFTELRELENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPDKDSCSCLTAAEVHPAGRYV
LCPSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

5

AXL de Homo sapiens - Dominio FN2 de Mus musculus (p33-AXL-mFN2): (SEQ ID NO: 135)
MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCLQVQGEPEVHWLRD
GQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLLEGLPYFLEEPEDRTV
AANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLDQAVPLATAPGHGPPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRATITVLPQQ
PRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLHPHTPY
HIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENVSAMRNGSQVLVWRWQEPVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPPEVL
MDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLVPLEPWRPGQGQPLHHLVSEPPRAFVSWPWWYVLL
GAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHK
VALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFP
PAPVVILPFMKHGDLSHFLYSRLGDQPVYLPQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVA
DFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLKQGN
RLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELRELENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADP
PTQDPDKDSCSCLTAAEVHPAGRYVLCSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

10

La unión de 1 µg/mL de anticuerpo anti-AXL a las quimeras de AXL de ser humano-ratón se determinó por citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 2. IgG1-b12 se incluyó como IgG1 de control de isotipo.

15

Todos los anticuerpos anti-AXL mostraron unión a AXL humana (**Figura 2A**), mientras que la unión fue anulada o fuertemente reducida cuando el ECD de la AXL humana fue reemplazado por su homólogo murino (**Figura 2B**). Se incluyó el anticuerpo monoclonal contra AXL de reacción cruzada de ser humano-ratón YW327.6S2 para confirmar la expresión de hsAXL-mmECD.

20

Los anticuerpos anti-AXL 107 y 613 mostraron una unión fuertemente reducida a hsAXL-mmlg1 (**Figura 2C**), indicando el reconocimiento de un epítipo en el dominio Ig1 de AXL. IgG1-AXL-148 e IgG1-AXL-171 mostraron una unión fuertemente reducida a hsAXL-mmlg2 (**Figura 2D**), indicando el reconocimiento de un epítipo en el dominio Ig2 de AXL. IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-733 mostraron una unión reducida a hsAXL-mmFN1 (**Figura 2E**), indicativa de un epítipo de unión en el dominio FN1 de AXL. Finalmente, la unión de IgG1-AXL-726 se perdió en hsAXL-mmFN2 (**Figura 2F**), indicando el reconocimiento de un epítipo dentro del dominio FN2.

25

La especificidad del dominio AXL para todos los anticuerpos anti-AXL se resume en la Tabla 6.

Tabla 6

Anticuerpo	Especificidad de dominio AXL	aa de AXL implicados en la unión
IgG1-AXL-107	Ig1	L121-Q129
IgG1-AXL-148	Ig2	D170-R190
IgG1-AXL-154	Fn1	Q272-A287, G297-P301
IgG1-AXL-154-M103L	n.d. ^a	n.d.
IgG1-AXL-171	Ig2	P170, T182-R190
IgG1-AXL-183	Fn1	No resuelto

Anticuerpo	Especificidad de dominio AXL	aa de AXL implicados en la unión
IgG1-AXL-183-N52Q	n.d.	n.d.
IgG1-AXL-613	Ig1	T112-Q124
IgG1-AXL-726	Fn2	A359, R386, Q436-K439
IgG1-AXL-726-M101L	n.d.	n.d.
IgG1-AXL-733	Fn1	No resuelto
IgG1-AXL-061	Ig1	I97-Q124
IgG1-AXL-137	Ig1	Q57, E92-T105
YW327.6S2	Ig1	G39-D59
^a n.d., no determinado		

Mapeo epitópico de alta resolución para identificar aminoácidos en el dominio extracelular de AXL implicado en la unión de anticuerpos contra AXL

5 Para identificar los aminoácidos en el dominio extracelular de AXL implicados en la unión de los anticuerpos anti-AXL, se generó una biblioteca de variantes de secuencia de AXL mediante la recombinación de secuencias de AXL derivadas de especies con niveles variables de homología con la secuencia de AXL humana en el dominio extracelular. Brevemente, un plásmido de expresión que codificaba AXL humana (Hs) se mezcló con plásmidos de clonación que codificaban homólogos de AXL de *Mus musculus* (Mm), *Monodelphis domestica* (Md; zarigüeya), *Anolis carolinensis* (Ac; lagarto), y *Tetraodon nigroviridis* (Tn; pez globo) o viceversa. Se utilizó una combinación de 10 dos cebadores específicos para el vector de clonación o de expresión para realizar una PCR que amplificara el dominio extracelular de AXL (ECD) con un tiempo de elongación abreviado, forzando la fusión y la re-asociación de hebras de replicación de ADN nacentes durante el ciclo de PCR. El ECD completo se amplificó utilizando una PCR anidada, nuevamente específica para productos de recombinación que contienen extremos que se originan a partir de ambos vectores.

15 Los productos de la PCR de ECD de AXL resultantes se clonaron en un vector de expresión creando AXL completa, y los plásmidos resultantes se secuenciaron, se clasificaron por la diferencia máxima con los vectores molde y se seleccionaron para crear un conjunto mínimo con un poder de diferenciación máximo. Los plásmidos que codificaban los homólogos de AXL de Hs, Mm, Md, Ac y Tn, cuatro plásmidos quiméricos de ser humano/ratón que 20 codificaban AXL de Hs con dominios Ig1, Ig2, Fn1 o Fn2 murinos, y los dieciséis plásmidos más diferenciadores de la biblioteca de recombinación se transfectaron en células HEK293-F de acuerdo con las especificaciones suministradas por el fabricante (Life technologies). Los datos de unión de FACS que utilizaba anticuerpos anti-AXL de 1 µg/mL se desconvolucionaron mediante la puntuación por aminoácido si la mutación se correlacionaba (+1) o no (-1) con la pérdida de unión, después de lo cual se realizó una corrección del momento inicial y se realizó una 25 normalización a una escala de -5 a +5, dando como resultado una puntuación de impacto por aminoácido sobre el ECD completo.

Los datos de unión desconvolucionados se resumen en la Tabla 6 como aminoácidos involucrados en la unión. Los anticuerpos cuyo sitio de unión no se pudo mapear a alta resolución debido a la falta de eventos de recombinación 30 en la proximidad del sitio de unión, se indican como no resueltos.

Ejemplo 4 - Funciones efectoras mediadas por Fc

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)

35 La capacidad de los anticuerpos anti-AXL para inducir ADCC de células de carcinoma epidermoide A431 se determinó como se explica a continuación. Como células efectoras, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos (UMC Utrecht, Países Bajos).

Marcaje de células diana

40 Se recogieron células A431 (5×10^6 células) en medio de cultivo (medio de cultivo RPMI 1640 con un suplemento de suero de ternera fetal al 10% (FSC)), al que se habían añadido 100 µCi de ^{51}Cr (Cromio-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos), y la mezcla se incubó en un baño de agua a 37°C durante 1 hora (h) 45 mientras se agitaba. Después del lavado de las células (dos veces en PBS, 1200 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en RPMI1640/FSC al 10% y se contaron por exclusión con azul tripán. Las células se diluyeron a una densidad de 1×10^5 células/mL.

Preparación de células efectoras

Las células mononucleares de sangre periférica (voluntarios sanos, UMC Utrecht, Utrecht, Países Bajos) fueron aisladas de 45 mL de sangre heparinizada recién extraída por Ficoll (Bio Whittaker; medio de separación de linfocitos, cat. 17-829E) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la resuspensión de las células en RPMI1640/FSC al 10%, las células se contaron por exclusión con azul tripán y se diluyeron a una densidad de 1×10^7 células/mL.

Ajuste de ADCC

Se pipetearon 50 μ L de células diana marcadas con Cr^{51} en placas de 96 pocillos, y se añadieron 50 μ L de anticuerpo, diluidos en RPMI1640/FSC al 10% (diluciones 1:3 en el intervalo de concentraciones finales de 0,01-10 μ g/mL). Las células se incubaron (temperatura ambiente (RT), 15 min), y se añadieron 50 μ L de células efectoras, lo que dio como resultado una razón de efector con respecto a diana de 100:1 (para la determinación de la lisis máxima, se añadieron 100 μ L de Triton-X100 al 5% en lugar de células efectoras; para la determinación de la lisis espontánea, se utilizaron 50 μ L de células diana y 100 μ L de RPMI1640/FSC al 10%). Las células se incubaron durante la noche a 37°C y con 5% de CO₂. Después de centrifugar las células (1200 rpm, 10 min), se recogieron 70 μ L de sobrenadante en tubos micrónicos y se contaron en un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de lisis específica} = (\text{cpm de la muestra} - \text{cpm de las células dianas solo}) / (\text{cpm de lisis máxima} - \text{cpm de las células diana solo})$$

en donde cpm es recuento por minuto.

IgG1-AXL-183-N52Q e IgG1-AXL-733 indujeron una ADCC de 15 a 21% en células A431 a una concentración de 10 μ g/mL (**Figura 3**). IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-726-M101L, IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-154-M103L no indujeron una ADCC significativa en células A431 a concentraciones de hasta 10 μ g/mL (**Figura 3**).

Ejemplo 5 - Características de unión de los productos conjugados de anticuerpo contra AXL-fármaco (AXL-ADC)

Las células HEK293T se transfectaron transitoriamente con construcciones de expresión para AXL humana completa (véase el Ejemplo 1). La unión de los anticuerpos anti-AXL y los ADC-AXL a estas células se evaluó mediante citometría de flujo. Las células HEK293 transfectadas de forma transitoria se incubaron con diluciones en serie de anticuerpos anti-AXL o AXL-ADC (diluciones 4:1; intervalo de concentración final de 0,003-10 μ g/mL) durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, las células se incubaron en 100 μ L con anticuerpo secundario a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. Como anticuerpo secundario, se utilizó anti-F(ab')₂ de IgG humana de cabra conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; Núm. cat. 109-116-098) diluido 1/100 en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, se resuspendieron en 120 μ L PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences).

Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

La **Figura 4** muestra que la unión de los anticuerpos anti-AXL a las células HEK293 que expresaban AXL-ECD humano fue similar a la unión de los AXL-ADC.

Ejemplo 6 - Citotoxicidad *in vitro* inducida por productos conjugados de fármacos y anticuerpos específicos para AXL

Las células LCLC-103H (cáncer de pulmón humano de células grandes) se cultivaron en RPMI 1640 con L-Glutamina (Cambrex; núm. de cat. BE12-115F) con un suplemento de Suero de Ternera Cosmic inactivado por calor al 10% (vol/vol) (Perbio; núm. de cat. SH30087.03), L-glutamina 2 mM (Cambrex; núm. de cat. US17-905C), 50 UI/mL de penicilina y estreptomina 50 μ g/mL (Cambrex; núm. de cat. DE17-603E). Se cultivaron células MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) en DMEM (Cambrex; núm. de cat. BE12-709F) con un suplemento de Suero de Ternera Cosmic inactivado por calor al 10% (vol/vol) (Perbio; núm. de cat. SH30087.03), Piruvato de sodio 1 mM (Cambrex; núm. de cat. BE13-115E), L-glutamina 2 mM (Cambrex; núm. de cat. US17-905C), MEM NEAA 100 μ M (Invitrogen; núm. de cat. 11140), 50 UI/mL de penicilina, y 50 μ g/mL de estreptomina (Cambrex; núm. de cat. DE17-603E). Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% (vol/vol). Las células LCLC-103H y MDA-MB-231 se cultivaron hasta casi la confluencia, después de lo cual las células se trataron con tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo y se hicieron pasar a través de un filtro celular (BD Falcon, núm. de cat. 352340) para obtener una suspensión celular única. Se sembraron 1×10^3 células en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos, y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante 5 horas a 37°C, 5% de CO₂ para permitir la adherencia a la placa.

Se prepararon diluciones en serie (4 veces; concentraciones finales que variaban de 0,00015 a 10 µg/mL) de productos conjugados de fármaco y anticuerpo contra AXL (AXL-ADC; véase el Ejemplo 1) en medio de cultivo y se añadieron a las placas. La incubación de las células con estaurosporina 1 µM (Núm. S6942-200, Sigma) se utilizó como referencia para el 100% de destrucción de las células tumorales. Las células no tratadas se utilizaron como referencia para el 0% de destrucción de las células tumorales. Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂. A continuación, se añadió el reactivo CellTiter-Glo (Promega; núm. de cat. G7571) a los pocillos (20 µl por pocillo) y las placas se incubaron durante 1,5 horas a 37°C, 5% de CO₂. Con posterioridad, se transfirieron 180 µL por pocillo a placas Optiplate™ blancas de 96 pocillos (PerkinElmer, Waltham, MA; núm. de cat. 6005299), que se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la luminiscencia en un lector multiplaca EnVision (Envision, Perkin Elmer).

AXL-ADCs IgG1-AXL-148-vcDuo3, IgG1-AXL-183-vcDuo3 e IgG1-AXL-726-vcDuo3 indujeron citotoxicidad en células LCLC-103H, con valores de CI50 entre 0,01 y 0,06 µg/mL, como se muestra en la **Figura 5A**. De manera similar, la **Figura 5B** muestra que estos AXL-ADC indujeron citotoxicidad de las células MDA-MB-231 con valores de CI50 entre 0,005 y 0,015 µg/mL.

Ejemplo 7 - Variantes de VH y VL de anticuerpos que permiten la unión a AXL

Las secuencias de proteínas de las regiones VH y VL del panel de anticuerpos anti-AXL (descritas en el Ejemplo 1) se alinearon y compararon para determinar la unión de AXL para identificar cambios de residuos de aminoácidos críticos o permisivos en las regiones VH o VL. Por lo tanto, los anticuerpos con regiones VH o VL idénticas se agruparon y se compararon para determinar la unión a AXL humana y las diferencias en las secuencias de VL o VH, respectivamente. La unión a AXL humana expresada de forma transitoria por las células HEK-293F se evaluó en el ensayo de escrutinio específico de antígeno homogéneo como se describe en el Ejemplo 1. La numeración de las posiciones de aminoácidos para los alineamientos realizados en el presente ejemplo se realizó basándose en las secuencias presentadas en la **Figura 6**, es decir, el primer aminoácido en la secuencia mostrada estaba numerado como posición '1', el segundo como posición '2', etc.

Primero, se agruparon los anticuerpos con secuencias de VL idénticas.

Se encontró que IgG1-AXL-148 e IgG1-AXL-140 tenían una secuencia de VL idéntica, y mostraban 1 diferencia de aminoácidos en la región CDR3 de HC (F por I en la posición de aminoácidos 109; **Figura 6A**). Ambos anticuerpos se unían a AXL humana (Tabla 7), lo que indica que el aminoácido en la posición 109 no es esencial para la unión del anticuerpo, suponiendo que una mutación identificada en la región CDR2 (G por A en la posición del aminoácido 56) no compensa la pérdida de unión (**Figura 6A**).

Se encontró que IgG1-AXL-726 e IgG1-AXL-187 tenían una secuencia de VL idéntica y ambos anticuerpos se unían a AXL humana (Tabla 7). Se permitían dos cambios de residuos de aminoácidos en la región CDR3 de HC (R por S en la posición 97 y A por T en la posición 105; **Figura 6B**) sin perder la unión, suponiendo que las mutaciones identificadas en la CDR1 (Y por H en la posición 32) y/o en las regiones marco (P3Q, V24I, Y25D, T86A y T117A) no compensan la pérdida de unión (**Figura 6B**).

Se encontró que IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-172 e IgG1-AXL-181 tenían una secuencia de VL idéntica y todos los anticuerpos se unían a AXL humana (Tabla 7). Las regiones CDR3 de estos tres anticuerpos eran idénticas, pero se permitía un cambio de residuo de aminoácido en la CDR1 de HC (S por N en la posición 31) o la región marco (H por Q en la posición 82) sin perder la unión (**Figura 6C**).

Se encontró que IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-608-01, IgG1-AXL-610-01 e IgG1-AXL-620-06 tenían una secuencia de VL idéntica, y mostraban una diferencia de aminoácidos en la región CDR3 de HC (N por D en la posición de aminoácido 101; **Figura 6D**). Todos los anticuerpos se unían a AXL humana (Tabla 7), lo que indica que el aminoácido en la posición 101 no es esencial, suponiendo que las mutaciones identificadas en la CDR2 de HC (V por A en la posición 58) y/o en las regiones marco (N35S, M37V, A61V, L70I, S88A) no compensan la pérdida de unión (**Figura 6D**).

A continuación, se agruparon los anticuerpos con secuencias de VH idénticas.

Se encontró que IgG1-AXL-613 e IgG1-AXL-613-08 tenían una secuencia de VH idéntica y mostraban cinco diferencias de aminoácidos en la región CDR3 de LC (RSNWL por YGSSY en las posiciones 92 a 96; **Figura 6E**). Ambos anticuerpos se unían a AXL humana (Tabla 7), lo que indica que la variación del aminoácido en las posiciones 92 a 96 está permitida y no afecta la unión del anticuerpo, suponiendo que las mutaciones identificadas en la CDR1 (delección de S en la posición 30), CDR2 (G51D), y/o en las regiones marco (G9A, S54N, R78S, Q100G, L104V) no compensan la pérdida de unión (**Figura 6E**).

Tabla 7

Anticuerpo	CE50 (µg/ml)	Unión máxima (unidades arbitrarias)
IgG1-AXL-140	0,0026	2889
IgG1-AXL-148	0,0036	3499
IgG1-AXL-171	0,003	2575
IgG1-AXL-172	0,0055	5378
IgG1-AXL-181	0,008	3598
IgG1-AXL-187	0,0065	2563
IgG1-AXL-608-01	0,0035	3318
IgG1-AXL-610-01	0,0023	2947
IgG1-AXL-613	0,0072	5211
IgG1-AXL-613-08	0,0242	2209
IgG1-AXL-620-06	0,0034	4352
IgG1-AXL-726	0,0471	3154

Ejemplo 8 - Citotoxicidad *in vitro* inducida por anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE

Conjugación de MMAE con anticuerpos anti-AXL

5 Los anticuerpos anti-AXL se purificaron mediante cromatografía de proteína A de acuerdo con procedimientos convencionales y se conjugaron con vcMMAE. El fármaco-conector vcMMAE se alquiló en las cisteínas de los anticuerpos reducidos de acuerdo con los procedimientos descritos en la bibliografía (véase [150], [151] y [152]). La reacción se sofocó mediante la adición de un exceso de N-acetilcisteína. Cualquier fármaco residual no conjugado se eliminó mediante purificación y los productos conjugados de fármaco y anticuerpo anti-AXL finales se formularon en PBS. Los productos conjugados de fármaco y anticuerpo anti-AXL se analizaron posteriormente para determinar la concentración (por absorbancia a 280 nm), la razón de fármaco con respecto a anticuerpo (DAR) mediante cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), la cantidad de fármaco no conjugado (por cromatografía de fase inversa), el porcentaje de agregación (por cromatografía de exclusión por tamaño, SEC-HPLC) y los niveles de endotoxina (por LAL). Los resultados se muestran a continuación en **Tabla 8**.

Tabla 8 - Descripción general de las diferentes características de los productos conjugados de anticuerpo-fármaco

Ensayo	ADC									
	IgG1-AXL-107	IgG1-AXL-148	IgG1-AXL-154-M103L	IgG1-AXL-171	IgG1-AXL-183-N52Q	IgG1-AXL-511	IgG1-AXL-613	IgG1-AXL-726-M101L	IgG1-AXL-733	IgG1-b12
Concentración (mg/mL)	7,18	9,63	6,57	3,69	6,71	5,77	6,17	7,37	7,71	1,58
DAR por HIC	3,97	3,96	3,71	3,65	3,92	3,87	4,23	4,12	4,08	4,00
% de anticuerpo no conjugado	4,68	5,58	6,13	7,11	8,68	8,35	5,13	4,99	3,74	1,89
% agregado por SEC-HPLC	6,3	2,28	2,9	3,3	5,2	5,1	6,4	4,0	3,5	2,5
Endotoxina (UE/mg)	2,3	1,2	2,6	3,1	5,9	4,5	2,0	3,6	7,6	11,5

20 Cultivo de células LCLC

Se cultivaron células -103H (cáncer de pulmón humano de células grandes) y células A431 (DMSZ, Braunschweig, Alemania) en RPMI 1640 con L-Glutamina (Cambrex; núm. de cat. BE12-115F) con un suplemento de Suero de

5 Ternera Cosmic inactivado con calor al 10% (vol/vol) (Perbio; núm. de cat. SH30087.03), L-glutamina 2 mM (Cambrex; núm. de cat. US17-905C), 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (Cambrex; núm. de cat. DE17-603E). Las células MDA-MB231 se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa y HEPES (Lonza Núm. BE12-709F), Suero Donante Bovino con Hierro (Life Technologies Núm. 10371-029), L-glutamina 2 mM (Lonza Núm. BE17-605E), Piruvato de sodio 1 mM (Lonza Núm. BE13-115E) y Solución de Aminoácidos No Esenciales en MEM (Life Technologies Núm. 11140). Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con 10 5% (vol/vol) de CO₂. Las células LCLC-103H, A431 y MDA-MB231 se cultivaron hasta casi la confluencia, después de lo cual las células se trataron con tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo y se hacen pasar a través de un filtro celular (BD Falcon, núm. de cat. 352340) para obtener una suspensión celular única. Se sembraron 1x10³ células en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos, y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante 5 horas a 37°C, 5% de CO₂ para permitir la adherencia a la placa.

Ensayo de citotoxicidad

15 Se prepararon diluciones en serie (concentraciones finales que variaban de 0,00015 a 10 µg/ml) de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en medio de cultivo y se añadieron a las placas. La incubación de las células con estaurosporina 1 µM (Núm. S6942-200, Sigma) se utilizó como referencia para un 100% de destrucción de células tumorales. Las células no tratadas se utilizaron como referencia para un 100% de crecimiento celular. Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂. A continuación, se añadió el reactivo CellTiter-Glo (Promega; núm. de 20 cat. G7571) a los pocillos (20 µL por pocillo) y las placas se incubaron durante 1,5 horas a 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, se transfirieron 180 µL por pocillo a placas Optiplate™ blancas de 96 pocillos (PerkinElmer, Waltham, MA; núm. de cat. 6005299), que se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la luminiscencia en un lector multiplaca EnVision (Envision, Perkin Elmer).

25 Los anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE indujeron un 50% de destrucción celular en células LCLC-103H a concentraciones entre 0,004 y 0,219 µg/mL como se muestra en **Tabla 9a** y **Figura 7**.

De manera similar, los AXL-ADC indujeron eficazmente la citotoxicidad en células A431 (**Tabla 9b**) y **Figura 15A**) y en células MDA-MB231 (**Tabla 9b** y **Figura 15B**).

30 **Tabla 9a - Citotoxicidad de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en células LCLC-103H (valores de CE50)**

ADC	CE50 (µg/mL)
IgG1-AXL-613-vcMMAE	0,004
IgG1-AXL-148-vcMMAE	0,012
IgG1-AXL-171-vcMMAE	0,018
IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE	0,018
IgG1-AXL-107-vcMMAE	0,022
IgG1-AXL-511-vcMMAE	0,032
IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE	0,044
IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE	0,113
IgG1-AX-733-vcMMAE	0,219

35 **Tabla 9b. Citotoxicidad de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en células A431 y MDA-MB-231 (valores CE50).**

ADC	CE50 (µg/ml)			
	A431 (n = 3)		MDA-MB231 (n = 2)	
	Media	d.t.	Media	d.t.
IgG1-AXL-107-vcMMAE	0,154	0,066	0,037	0,005
IgG1-AXL-148-vcMMAE	0,070	0,013	0,012	0,004
IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE	0,719	0,091	0,396	0,195
IgG1-AXL-171-vcMMAE	0,206	0,074	0,035	0,006
IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE	1,157	0,160	0,139	0,028

ADC	CE50 (µg/ml)			
	A431 (n = 3)		MDA-MB231 (n = 2)	
	Media	d.t.	Media	d.t.
IgG1-AXL-511-vcMMAE	0,093	0,020	0,052	0,003
IgG1-AXL-613-vcMMAE	0,109	0,078	0,005	0,001
IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE	0,270	0,157	0,022	0,002
IgG1-AXL-733-vcMMAE	1,253	0,228	0,881	0,182

Ejemplo 9 - Tratamiento terapéutico de xenoinjertos tumorales LCLC-103H en ratones SCID con anticuerpos anti-AXL conjugados con MMAE

5 La eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-AXL conjugados con MMAE se determinó en tumores de xenoinjerto LCLC-103H subcutáneo (SC) establecidos en ratones SCID. Se inyectaron 5×10^6 células tumorales LCLC-103H (carcinoma de pulmón de células grandes) (obtenidas de Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) en 200 µL de PBS se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones SCID hembra. Comenzando 14-21 días después de la inoculación de las células tumorales, cuando el tamaño promedio del tumor fue $> 100\text{-}200 \text{ mm}^3$ y se observó un crecimiento tumoral distinto, se administró una inyección única con 1 mg/kg (20 µg/ratón) de anticuerpos IgG1-AXL-vcMMAE (como se describe en el Ejemplo complementario 1) o control (IgG1-b12 no conjugado) por vía intraperitoneal (100 µL/ratón). El volumen tumoral se determinó al menos dos veces por semana. Los volúmenes tumorales (mm^3) se calcularon a partir de las mediciones del calibre (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

15 El panel de anticuerpos anti-AXL-vcMMAE mostró un amplio intervalo de actividad antitumoral en tumores LCLC-103H SC establecidos (**Figura 8**). Los clones IgG1-AXL-733-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE e IgG1-AXL-148-vcMMAE indujeron regresión tumoral, los clones AXL-171-vcMMAE, IgG1-AXL-511-vcMMAE e IgG1-AXL-613-vcMMAE-613-vcMMAE e IgG1-AXL-613 inhibición del crecimiento tumoral inducido, y los clones IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE, IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE e IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE mostraron una inhibición nula o solo leve del crecimiento tumoral.

25 El análisis estadístico el último día en el que todos los grupos estaban intactos (día 30) utilizando ANOVA de Una Vía (prueba de comparaciones múltiples de Dunnett versus IgG1-b12 de control) indicó una diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$) en el volumen tumoral entre IgG1-b12 versus IgG1-AXL-733-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE e IgG1-AXL-148-vcMMAE. El tratamiento con estos clones condujo en algunos ratones dentro de estos grupos a completar la reducción tumoral. El tratamiento con los clones IgG1-AXL-171-vcMMAE, IgG1-AXL-511-vcMMAE e IgG1-AXL-613-vcMMAE también mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con IgG1-b12, pero las diferencias fueron menos pronunciadas ($p < 0,05$ a $p < 0,001$). El crecimiento tumoral de ratones tratados con los clones IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE, IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE e IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE no se vio afectado significativamente en comparación con el control IgG1-b12.

35 La actividad antitumoral de los anticuerpos anti-AXL-vcMMAE se observó en varios otros modelos tumorales *in vivo*. En dos modelos de xenoinjerto derivados de líneas celulares (A431; adenocarcinoma epidermoide y MDA-MB-231; cáncer de mama), los anticuerpos anti-AXL-vcMMAE indujeron la inhibición del crecimiento tumoral, y la regresión tumoral fue inducida por anticuerpos anti-AXL-vcMMAE en dos modelos de xenoinjerto derivado de pacientes con cáncer de páncreas y cáncer de cuello uterino.

40 Ejemplo 10 - Eficacia antitumoral de AXL-ADC en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente de cáncer de páncreas (PDX) con expresión heterogénea de la diana

45 La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE se determinó en el modelo PDX de cáncer de páncreas PAXF1657 (experimentos realizados por Oncotest, Freiburg, Alemania). El tejido tumoral del páncreas humano se implantó por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones NMRI nu/nu hembra de 5-7 semanas de edad. La aleatorización de los animales se realizó de la siguiente manera: se distribuyeron animales que portaban un tumor con un volumen entre 50 y 250 mm^3 , preferiblemente 80 - 200 mm^3 , en 7 grupos experimentales (8 animales por grupo), considerando una mediana y una media comparables del volumen tumoral del grupo. El día de la aleatorización (día 0), se administraron los 3 ADC por vía intravenosa (i.v.) a 4 mg/kg o 2 mg/kg, y el grupo de control recibió una dosis única de IgG1-b12 (4 mg/kg). Los volúmenes tumorales (mm^3) se verificaron dos veces por semana y se calcularon a partir de las mediciones del calibre (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

50 La tinción de los tumores PAXF1657 se realizó con técnicas convencionales de inmunohistoquímica. Brevemente, los tejidos congelados se fijaron con acetona durante 10 minutos y la peroxidasa endógena se agotó utilizando

hidrógeno peroxidasa. Posteriormente, las secciones de tejido se bloquearon con suero de ratón normal y la tinción se realizó por incubación con 5 µg/mL de una reserva de 5 anticuerpos IgG1-AXL (IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-726). Después de la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), se visualizó la HRP con amino-etil carbazol (AEC; dando como resultado un color rojo). Cada portaobjetos se contratiñó con hematoxilina (azul) para identificar los núcleos y se cubrió con una lámina en glicergel. Los cortes de tejido inmunoteñido se digitalizaron en un microscopio manual Zeiss (AxioSkop) con aumentos de 10x y 40x.

La **Figura 9** muestra una expresión heterogénea de AXL en tumores PAXF1657. Mientras que se observa una fuerte tinción de AXL en algunas células tumorales, otras células no muestran tinción de AXL. En la foto en blanco y negro, la tinción AXL aparece en color gris oscuro. La tinción con hematoxilina (núcleos) aparece como color gris claro.

Figura 10A muestra que el tratamiento de ratones con 2 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE redujo significativamente el crecimiento de tumores PAXF1657 en comparación con el grupo de control. A una dosis de 4 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE indujeron la regresión tumoral de los tumores PAXF1657. El día 14 después del tratamiento, el tamaño promedio del tumor en ratones que habían sido tratados con 2 mg/kg o 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-MMAE, IgG1-AXL-148-MMAE o IgG1-AXL-733-MMAE fue significativamente más pequeño que en ratones que habían sido tratados con IgG de control de isotipo (IgG1-b12) ($p < 0,001$; prueba de comparación múltiple de Tukey).

El tratamiento de ratones con IgG1-AXL-148 no conjugado no produjo actividad antitumoral en el modelo PAXF1657 (**Figura 10B**). Sin embargo, IgG1-AXL-148-vcMMAE conjugado, indujo actividad antitumoral dependiente de la dosis en este modelo (**Figura 10B**), ilustrando que la capacidad terapéutica de los AXL-ADC depende de la actividad citotóxica de MMAE.

Por otra parte, el tratamiento de ratones con el ADC IgG1-b12-vcMMAE no dirigido no mostró actividad antitumoral en el modelo PAXF1657 (**Figura 10C**), ilustrando que la capacidad terapéutica de los AXL-ADC también depende de la unión específica a la diana.

30 Ejemplo 11: Anticuerpos contra AXL que se unen al dominio Ig1

La especificidad del dominio AXL de los anticuerpos contra AXL IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 e IgG1-AXL-613 se determinó utilizando un panel de mutantes para AXL quiméricos de ser humano-ratón. Se incluyó el anticuerpo monoclonal contra AXL de reacción cruzada de ser humano-ratón YW327.6S2 para confirmar la expresión de hsAXL-mmECD. Se incluyó IgG1-b12 como anticuerpo de control de isotipo. Se generaron cinco moléculas AXL quiméricas diferentes y se expresaron en HEK293F como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, el dominio I de tipo Ig humano (Ig1), el dominio II de tipo Ig (Ig2), el dominio I de tipo FNIII humano (FN1) o el dominio II de tipo FNIII humano (FN2) se reemplazaron por sus homólogos murinos. La unión de 1 µg/mL de anticuerpo anti-AXL a las quimeras de AXL de ser humano-ratón se determinó por citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 2.

Todos los anticuerpos anti-AXL mostraron unión al AXL humana. (**Figura 11A**), mientras que la unión se anuló cuando el ECD de AXL humana se reemplazó por su homólogo murino (**Figura 11B**). Como se esperaba, el anticuerpo monoclonal contra AXL de ser humano-ratón con reacción cruzada con YW327.6S2 mostró unión a hsAXL-mmECD, confirmando la expresión adecuada de hsAXL-mmECD.

Los anticuerpos contra AXL IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 e IgG1-AXL-613 mostraron una unión fuertemente reducida a hsAXL-mmIg1 (**Figura 11C**), ilustrando el reconocimiento de un epítipo en el dominio Ig1 de AXL. En línea con esto, la unión de IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 e IgG1-AXL-613 a hsAXL-mmIg2 (**Figura 11D**), hsAXL-mmFN1 (**Figura 11E**) o hsAXL-mmFN2 (**Figura 11F**) no resultó afectada. El anticuerpo monoclonal contra AXL de ser humano-ratón con reacción cruzada YW327.6S2 mostró unión a todas las variantes quiméricas de AXL, confirmando la expresión adecuada de estas proteínas.

55 Ejemplo 12 - Los anticuerpos contra AXL IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 se unen al dominio Ig1 pero no compiten con la unión a Gas6

Se sometió a prueba si la unión de los anticuerpos contra AXL IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 o IgG1-AXL-613 interfería en la unión del ligando de AXL Gas6 a AXL. Por lo tanto, se sometió a prueba la unión de Gas6 a células A431 que se habían incubado previamente con 10 µg/mL de anticuerpos contra AXL como se describe en el Ejemplo 2. Se incluyeron como controles la incubación previa con el anticuerpo contra AXL YW327.6S2, que se había descrito que competía con Gas6 por la unión a AXL, IgG1-b12 (control de isotipo) o medio (control negativo).

Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

La **Figura 12** y la **Tabla 11** muestran que la unión de Gas6 a las células A431 que se habían incubado previamente con los anticuerpos IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 fue similar a la de los controles con IgG1-b12 y medio. Esto ilustra que la unión de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 a AXL no interfiere en la unión de Gas6, como se muestra en el Ejemplo 2. La unión de Gas6 a las células A431 se redujo en gran medida en presencia de IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-137 y el anticuerpo de control AXL YW327.6S2 en comparación con los controles con IgG1-b12 y medio.

En los experimentos en los que las células A431 se preincubaron con Gas6, los valores de unión máxima de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 fueron comparables con la unión de anticuerpos en ausencia de Gas6 (la unión máxima después de la preincubación de Gas6 fue de 91-108 % de unión sin preincubación de Gas6) (**Tabla 11**). Los valores de CE₅₀ para la unión de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 con o sin preincubación con Gas6 estaban en el mismo intervalo, o algo más altos después de la preincubación de Gas6 (**Tabla 11**), ilustrando que IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 no compiten con la unión a Gas6.

De manera similar al anticuerpo de control YW327.6S2, la unión de las células IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 a las células A431 se redujo considerablemente en presencia de Gas6 en comparación con la unión sin Gas6 (la unión máxima después de la preincubación con Gas6 fue de un 40-43% de la unión sin preincubación de Gas6; **Tabla 11**). Los valores de CE₅₀ para IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 no se pudieron determinar adecuadamente después de la incubación previa con Gas6 (**Tabla 11**). Esto muestra que IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 compiten con Gas6 para unirse a AXL.

Estos datos demuestran que los anticuerpos que se unen al dominio Ig1 de AXL tienen un efecto diferencial sobre la unión a Gas6.

Tabla 11

Anticuerpo	Anticuerpo que se une a células A431			Unión de Gas6 a células A431	
	CE50 sin Gas6 (µg/mL) media (d.t.)	CE50 en presencia de Gas6 (µg/mL) media (d.t.)	Unión máxima en presencia de Gas6 (% de unión en ausencia de Gas6) media (d.t.)	CE50 en presencia de anticuerpos contra AXL (µg/mL) media (d.t.)	Unión máxima en presencia de anticuerpos contra AXL (% de unión en presencia de anticuerpo de control) media (d.t.)
IgG1-AXL-061	0,15 (n.a.)	n.a.	43 (28)	n.a.	22 (8)
IgG1-AXL-107	0,16 (0,17)	0,94 (1,18)	91 (5)	0,78 (0,54)	96 (8)
IgG1-AXL-137	0,11 (0,10)	n.a.	40 (18)	n.a.	36 (4)
IgG1-AXL-613	0,09 (0,09)	0,10 (0,10)	108 (22)	0,57 (0,36)	100 (11)
YW327.6S2	0,09 (0,09)	1,90 (1,04) [*]	41 (24)	5,53 (7,09) [*]	17 (10)
b12	n.a. ^a	n.a.	n.a.	0,40(0,11)	100

n.a., no aplicable
^{*} Valores de CE50 menos precisos debido a la baja unión.

Ejemplo 13 - Eficacia antitumoral *in vivo* de AXL-ADC en modelos de xenoinjerto con y sin producción autocrina (endógena) de Gas6

Producción de Gas6 de células tumorales A431 y LCLC-103H

Se sometió a prueba si las células A431 y las células LCLC-103H producían Gas6. Por lo tanto, las células se cultivaron en medio de cultivo completo durante 3 días. Los niveles de Gas6 en el sobrenadante se determinaron utilizando ELISA Quantikine Human Gas6 (R&D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo utiliza la técnica cuantitativa ELISA sándwich. Previamente se ha aplicado como recubrimiento un Ab monoclonal específico para Gas6 humano sobre una microplaca. Los controles y las muestras se pipetea en los pocillos y cualquier Gas6 humano presente se une el Ab inmovilizado. Después de eliminar cualquier sustancia no unida, se añade a los pocillos un Ab policlonal ligado a enzima específico para Gas6 humano. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo de enzima-Ab no unido, se añade un sustrato a los pocillos y se desarrolla el color en proporción a la cantidad de Gas6 humano unido en la etapa inicial. El desarrollo del color se detiene y se mide la intensidad del color.

Se descubrió que el medio de cultivo celular acondicionado por células A431 contenía 2576 ng/mL de Gas6, mientras que la concentración de Gas6 en el medio acondicionado por células LCLC-103H era más de 20 veces menor. (Tabla 12).

5

Tabla 12 - Producción de gas6 en medio acondicionado de células tumorales.

Línea celular	Gas6 en el sobrenadante (ng/mL)
LCLC-103H	126
A431	2576

Actividad antitumoral de AXL-ADC *in vivo*

10 Se determinó la actividad antitumoral *in vivo* de IgG1-AXL-061-vcMMAE (ligante de IgG1), IgG1-AXL-107-vcMMAE (ligante de IgG1), IgG1-AXL-137-vcMMAE (ligante de IgG1), IgG1-AXL-148-vcMMAE (ligante de Ig2), IgG1-AXL-183-vcMMAE (ligante de FN1) e IgG1-AXL-726-vcMMAE (ligante de FN2) en el modelo tumoral A431 (carcinoma epidermoide), que produce altos niveles de Gas6 y el modelo tumoral LCLC-103H (carcinoma de pulmón de células grandes), que produce bajos niveles de Gas6.

15

La inducción tumoral se realizó mediante inyección subcutánea de 5×10^6 células tumorales A431 o LCLC-103H (ambas obtenidas de Leibniz-Institut - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) en 200 μ L de PBS en el flanco derecho de ratones SCID hembra. El tratamiento se inició 14-21 días después de la inoculación de células tumorales, cuando el tamaño promedio del tumor era $>100-200 \text{ mm}^3$ y se observó un claro crecimiento tumoral. Los ratones recibieron una inyección única o un total de 4 inyecciones intraperitoneales quincenales con ADC IgG1-AXL-vcMMAE o anticuerpo de control (IgG1-b12 no conjugado), como se indica. El volumen tumoral se determinó al menos dos veces por semana. Los volúmenes tumorales (mm^3) se calcularon a partir de las mediciones del calibre (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

20

25 La **Figura 13A** muestra que el tratamiento de ratones con IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE indujo la inhibición del crecimiento de tumores A431.

25

La **Figura 13B** muestra que el tratamiento de ratones con IgG1-AXL-148-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE (ligante de FN1) e IgG1-AXL-726-vcMMAE (ligante de FN2) indujo la inhibición del crecimiento de tumores A431. En contraste, los clones IgG1-AXL-061-vcMMAE e IgG1-AXL-137-vcMMAE no mostraron actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto A431.

30

La **Figura 14A** muestra que el tratamiento de ratones con 3 mg/kg de IgG1-AXL-061-vcMMAE, IgG1-AXL-137-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE indujo la regresión de los tumores en el modelo de xenoinjerto LCLC-103H. Del mismo modo, el tratamiento de ratones con 1 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE o 1 mg/kg de IgG1-AXL-613-vcMMAE indujo la regresión de los tumores LCLC-103H (**Figura 14B**).

35

En resumen, todos los AXL-ADC mostraron actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto LCLC-103H que produce bajos niveles de Gas6. En el modelo de xenoinjerto A431, que produce altos niveles de Gas6, la actividad antitumoral solo se observó para aquellos AXL-ADC que no competían con el ligando de AXL Gas6.

40

Ejemplo 14 - Expresión de AXL en diferentes indicaciones tumorales

45 La expresión de AXL se evaluó en micromatrices de tejido tumoral (TMA) incluido en parafina, fijado con formalina (FFPE) recién cortado que comprenden núcleos de tejido de pacientes con cáncer de tiroides, esófago, ovario, páncreas, pulmón, mama, cuello uterino o endometrio, o melanoma maligno. Las TMA se obtuvieron de US BioMax.

45

Los portaobjetos de matriz tumoral FFPE se desparafinaron y se sometieron a recuperación de antígeno (pH 6) y la peroxidasa endógena se agotó por incubación con H₂O₂ al 0,1% en tampón citrato/fosfato. Para detectar la expresión de AXL, las TMA se incubaron con anti-AXL de conejo (Santa Cruz, Núm. de cat.: sc-20741) a una concentración de 1 μ g/mL durante 60 minutos (temperatura ambiente (RT)). Para identificar las células (tumorales) de origen epitelial, las TMA se incubaron con anti-citoqueratina de conejo (Abcam, Núm. de cat. Ab9377) a una dilución de 1:50 durante 60 min (RT). Después de una etapa de lavado, las TMA se incubaron con polímero de dextrano anti- IgG de conejo conjugado con peroxidasa (ImmunoLogic, Núm. de cat.: DPVR55HRP) para detectar la unión de los anticuerpos anti-AXL y anti-citoqueratina de conejo. Finalmente, la unión del polímero de dextrano anti- IgG de conejo se visualizó con di-amino-benzadina (DAB; color marrón; DAKO, Núm. de cat.: K346811). En la TMA con núcleos de tejido de melanoma maligno, se visualizó la unión del polímero de dextrano anti- IgG de conejo con amino-etil carbazol (AEC; color rojo; Vector, SK4200). Los núcleos en las TMA se visualizaron con hematoxilina

55

(color azul).

Las TMA inmunoteñidas para AXL y citoqueratina se digitalizaron con un escáner de diapositivas Aperio con un aumento de 20x y la inmunotinción se cuantificó con un soporte lógico de análisis de imágenes de tejido (soporte lógico Definiens Tissue Studio, versión 3.6.1), utilizando un algoritmo basado en células. El algoritmo fue diseñado para identificar y cuantificar el porcentaje de células positivas para AXL o citoqueratina en las biopsias (intervalo 0 - 100%) y para cuantificar la intensidad de tinción de AXL en células tumorales positivas para AXL (densidad óptica (DO); intervalo 0 - 3) en cada núcleo tumoral. Las células tumorales se puntuaron como AXL positivas, cuando la DO de AXL fue al menos 0,1. El porcentaje de células tumorales positivas para AXL por núcleo tumoral (intervalo 0 - 100%) se calculó dividiendo el número total de células positivas para AXL por el número total de células positivas para citoqueratina en núcleos tumorales secuenciales. La intensidad de tinción (DO) de AXL promedio en cada núcleo tumoral se calculó dividiendo la suma de DO de AXL de todas las células tumorales positivas para AXL por el número de células tumorales positivas para AXL.

La matriz tumoral de pacientes con melanoma maligno se puntuó manualmente. La intensidad de tinción de AXL se puntuó como débil (1+), moderada (2+) o fuerte (3+) y el porcentaje de células de melanoma positivas para AXL se puntuó en intervalos de 10% (intervalo 0 - 100%).

La **Figura 16** proporciona una representación gráfica de la expresión de AXL en núcleos tumorales de cáncer de tiroides, esófago, ovario, mama, pulmón, páncreas, cuello uterino y endometrio. La **Tabla 13** muestra el porcentaje de núcleos tumorales que mostraron expresión de AXL en más del 10% de las células tumorales, para cada indicación. La **Figura 17** muestra un ejemplo representativo de un núcleo de tejido inmunoteñido para AXL, para cada indicación. Las figuras ilustran la expresión heterogénea de AXL en el problema tumoral.

25

Tabla 13

Indicación tumoral	Subtipo	% de núcleos tumorales (pacientes) con > 10% de células tumorales positivas para AXL
Cáncer de esófago	Adenocarcinoma (n = 19)	73
	Carcinoma de células escamosas (n = 60)	55
Cáncer de ovarios	Todos los subtipos (n = 52)	90
Cáncer de páncreas	Todos los subtipos (n = 58)	60
Cáncer de pulmón (NSCLC)	Carcinoma de células escamosas SSC (n = 52)	63
	Adenocarcinoma (n = 48)	67
Cáncer de pulmón (SCLC)	SCLC (n = 5)	60
Cáncer de tiroides	Todos los subtipos (n = 48)	92
Cáncer de útero	Todos los subtipos (n = 60)	88
Cáncer de mama	TNBC (n = 54)	24
Cáncer de cuello uterino	Todos los subtipos (n = 54)	93
Melanoma	Melanoma maligno (n = 67)	6

Abreviaturas utilizadas: NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas; SCLC, cáncer de pulmón de células pequeñas; TNBC, cáncer de seno triple negativo

Ejemplo 15 - Los anticuerpos contra AXL se unen específicamente a AXL, pero no a otros miembros de la familia de receptores TAM.

30 **Expresión de AXL, MER y TYRO3 humanas en células HEK-293F**

Se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para la expresión de varias proteínas completas: AXL humana (Homo sapiens) (número de acceso de Genbank NP_068713.2), MER humana (número de acceso de Genbank EAW52096.1 y TYRO3 humana (número acceso de Genbank Q06418.1). Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia óptima de Kozak (GCCGCCACC)

35

[Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208]. Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.3 (Invitrogen).

5 Las células 293-F Freestyle™ (un subclón de HEK-293 adaptado al crecimiento en suspensión y medio Freestyle definido químicamente, (HEK-293F)) se obtuvieron de Invitrogen y se transfectaron con los plásmidos de expresión utilizando 293fectina (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se hicieron crecer durante 24-48 horas.

10 Estudio de unión de anticuerpos contra AXL a AXL humana, MER humana o TYRO3 humana

10 Las células HEK-293F transfectadas transitoriamente con construcciones de expresión para AXL, MER o TYRO3 humanas completas se evaluaron para determinar la unión de anticuerpos HuMab-AXL mediante citometría de flujo. Las células HEK-293F transfectadas se incubaron con diluciones en serie de anticuerpos contra AXL (diluciones 1:4; intervalo de concentración final 0,002-10 µg/ml) durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, las células se incubaron con anti-F(ab')₂ de IgG humana de cabra conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; Núm. de cat. 109-116-098) diluido 1/100 en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% (volumen final 100 µL). A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, se resuspendieron en 120 µL de PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences). Las tinciones con anti-Mer humana de ratón (R&D Systems, cat. Mab8912) y anti-Tyro3 humana de ratón (Dtk) (R&D Systems, cat. MAB859) se incluyeron como controles para la expresión, IgG1-b12 se incluyó como un anticuerpo de control de isotipo sin unión. Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

25 La **Figura 18A** muestra que los anticuerpos Humab-AXL mostraron una unión dependiente de la dosis a las células HEK293 que expresaban AXL humana. Por el contrario, no se observó unión de los anticuerpos HuMab-AXL a las células que expresaban MER (**Figura 18B**) o TYRO3 (**Figura 18C**) o a células HEK293 no transfectadas (**Figura 18D**). La tinción con anticuerpos específicos para MER y Tyro3 confirmó que las células transfectadas mostraban una expresión adecuada de MER (**Figura 18F**) o TYRO3 (**Figura 18G**), respectivamente.

30 **Ejemplo 16 - Internalización de anticuerpos contra AXL unidos a la superficie celular**

Internalización de HuMab-AXL unido a la superficie celular evaluada por citometría de flujo

35 La internalización de los anticuerpos HuMab-AXL unidos a la superficie celular a las células MDA-MB-231 y Calu-1 (línea celular de carcinoma de pulmón humano; ATCC, número de catálogo HTB-54) se evaluó mediante citometría de flujo. Se sembraron 50.000 células en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran durante 6 horas a 37°C. Las placas se incubaron a 4°C durante 30 minutos antes de la incubación con diluciones en serie de anticuerpos contra AXL (intervalo de concentración final 0,0032-10 µg/mL) a 4°C durante 1 hora. Posteriormente, el medio se reemplazó por medio de cultivo de tejido sin anticuerpo y las células se incubaron durante la noche (16-18 horas) a 37°C o 4°C. Con posterioridad, las células se desprendieron con 40 µL de solución de tripsina caliente, se lavaron con PBS enfriado con hielo/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con anti-F(ab')₂ de IgG humana de cabra conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; Núm. de cat. 109-116-098) diluido 1/100 en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% (volumen final 100 µL), para detectar anticuerpos contra AXL sobre la superficie celular. Finalmente, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, se resuspendieron en 120 µL PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en FACS Cantoll (BD Biosciences).

50 Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

La **Figura 19** muestra que, para todos los anticuerpos HuMab contra AXL y a todas las concentraciones sometidas a prueba, se detectó más anticuerpo sobre la membrana plasmática de las células que se habían incubado a 4°C después de la unión del anticuerpo, en comparación con las células que se habían incubado a 37°C. Esto ilustra que, a 37°C, los anticuerpos contra AXL se internalizan al unirse a la membrana plasmática.

Ensayo de internalización Fab-TAMRA/QSY7 y degradación intracelular

60 La internalización de los anticuerpos contra AXL se evaluó en el ensayo de internalización Fab-TAMRA/QSY7. Este ensayo utiliza un par de fluoróforo (TAMRA) y de extintor (QSY7). Muy cerca, por ejemplo, tras la conjugación con la misma proteína, QSY7 sofoca la fluorescencia de TAMRA. En este ejemplo, se conjugaron los fragmentos anti-Fab de IgG humana de cabra (Jackson Immunoresearch) con TAMRA/QSY7 (Fab-TAMRA/QSY7) como se ha descrito (Ogawa et al. Mol Pharm 2009; 6 (2): 386-395), y los HuMab contra AXL (1,5 µg/ml) se preincubaron con Fab-TAMRA/QSY7 (12 µg/mL; 30 min, 4°C). El complejo se añadió posteriormente a células LCLC-103H y se incubó

durante 24 h de incubación en la oscuridad, en condiciones de agitación (200 rpm, 37°C). La internalización del complejo HuMab-Fab-TAMRA/QSY7 y la degradación intracelular en los endosomas y lisosomas provoca la disociación de TAMRA/QSY7, lo que da como resultado la eliminación de la extensión de TAMRA. La fluorescencia de TAMRA de las células LCLC-103H que se habían incubado con anticuerpos contra AXL complejados con Fab-TAMRA/QSY7 se midió en un FACS Canto-II (BD Biosciences).

Como se muestra en la **Figura 20**, la intensidad de fluorescencia de las células LCLC-103H se potenció tras la incubación con el complejo anticuerpo contra AXL-Fab-TAMRA/QSY7, en comparación con IgG1-b12-Fab-TAMRA/QSY7 o Fab-TAMRA/QSY7 solo. Esto ilustra que los anticuerpos contra AXL se internalizan al unirse a las células LCLC-103H.

Ejemplo 17 - Eficacia antitumoral de los AXL-ADC en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer de esófago (PDX)

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo de PDX esofágico subcutáneo ES0195 en ratones carentes de sistema inmune BALB/c (experimentos realizados por Crown Bioscience. Provincia de Taicang Jiangsu, China). Se utilizaron fragmentos de tumor de ratones donantes que portaban xenoinjertos de esófago derivados de paciente (ES0195) para la inoculación en ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c. A cada ratón se le inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho un fragmento de tumor (2-3 mm de diámetro) y se permitió que los tumores crecieran hasta que el volumen del tumor fuera de aproximadamente 150 mm³. La aleatorización de los animales se realizó de la siguiente manera: los animales que portaban un tumor con un volumen de aproximadamente 150 mm³ se distribuyeron en 5 grupos experimentales (8 animales por grupo), considerando una mediana y una media comparables del volumen tumoral del grupo. Los grupos de tratamiento fueron: IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-107-vcMMAE y paclitaxel. Se administraron dosis de los anticuerpos y los ADC por vía intravenosa (iv) a 4 mg/kg el día de la aleatorización (día 0) y el día 7. Las dosis de paclitaxel se administraron por vía intraperitoneal (ip) a 20 mg/kg los días 0, 7 y 14. Los volúmenes tumorales (mm³) se verificaron dos veces por semana y se calcularon a partir de las mediciones del calibre (PLEXX) como: 0,52 x (largo) x (ancho)².

La **Figura 21** muestra que el tratamiento de ratones con IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo la regresión tumoral de los tumores ES0195 en comparación con los grupos de control con IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE (p <0,001 el día 23, prueba ANOVA de Una Vía). El tratamiento de los ratones con el ADC IgG1-b12-vcMMAE no dirigido no mostró actividad antitumoral en este modelo, lo que ilustra que la capacidad terapéutica de los AXL-ADC depende de la unión específica a la diana. Los ratones que fueron tratados con paclitaxel mostraron inhibición del crecimiento tumoral, pero esto fue menos eficaz en comparación con el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (p <0,05 el día 23, prueba ANOVA de Una Vía).

Ejemplo 18 - Eficacia antitumoral de AXL-ADC en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de cáncer de cuello uterino

Se evaluó la actividad antitumoral de IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de cuello uterino derivado de paciente CEXF 773 en ratones NMRI nu/nu (Harlan, Países Bajos). Los experimentos fueron realizados por Oncotest (Freiburg, Alemania).

Se obtuvieron fragmentos de tumores de xenoinjertos en fases en serie en ratones carentes de sistema inmunitario. Después de la extracción de los ratones donantes, los tumores se cortaron en fragmentos (4-5 mm de diámetro) y se colocaron en PBS (con 10% de penicilina/estreptomina) hasta la implantación subcutánea. Los ratones bajo anestesia con isoflurano recibieron implantes tumorales subcutáneos unilaterales en el flanco. Los tumores se dejaron crecer hasta que el volumen del tumor fue de 50-250 mm³.

La aleatorización de los animales se realizó de la siguiente manera: los animales que portaban un tumor con un volumen de 50-250 mm³ se distribuyeron en 4 grupos experimentales (8 animales por grupo), considerando una mediana y una media comparables del volumen tumoral del grupo. Los grupos de tratamiento fueron: IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE. Se administraron dosis de los anticuerpos y los ADC por vía intravenosa (i.v.) a 4 mg/kg el día de la aleatorización (día 0) y el día 7. Los volúmenes tumorales (mm³) se verificaron dos veces por semana y se calcularon a partir de las mediciones del calibre (PLEXX) como: 0,52 x (largo) x (ancho)².

La **Figura 22** muestra que el tratamiento de los ratones con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE indujo la regresión tumoral de los tumores CEXF 773 en comparación con los grupos de control con IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE. El tratamiento de ratones con el ADC IgG1-b12-vcMMAE no dirigido no mostró actividad antitumoral en este modelo, lo que ilustra que la capacidad terapéutica de los AXL-ADC depende de la unión específica a la diana. El análisis estadístico del tamaño del tumor el día 28 (Kruskal-Wallis y Mantel-Cox utilizando un corte del tamaño del tumor de 500 mm³), mostraron que el tamaño promedio del tumor en ratones tratados con

IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE fue significativamente menor que en ratones que habían sido tratados con IgG1-b12 e IgG1-b12-vcMMAE ($p < 0,001$). IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE fueron igualmente eficaces.

5 **Ejemplo 19 - Eficacia antitumoral de los AXL-ADC en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama ortotópico**

0456] La actividad antitumoral de IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE se evaluó en un modelo de xenoinjerto MDA-MB-231 D3H2LN ortotópico.

10 Se implantaron células MDA-MB-231-luc D3H2LN Bioware (adenocarcinoma de glándula mamaria; Perkin Elmer, Waltham, MA) en la almohadilla de grasa mamaria de ratones SCID hembra (C.B-17/lcrPrkdc-scid/CRL) de 6-11 semanas de edad (Charles-River) bajo anestesia con isoflurano. Se permitió que los tumores crecieran y los ratones se aleatorizaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de $\sim 325 \text{ mm}^3$. Por lo tanto, los ratones se distribuyeron en 4 grupos experimentales (6-7 animales por grupo), considerando una mediana y una media comparables del volumen tumoral del grupo. Los grupos de tratamiento fueron: IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE. Los animales recibieron un total de 4 dosis quincenales de 3 mg/kg de anticuerpo o ADC a partir del día de la aleatorización. Los volúmenes tumorales (mm^3) se verificaron dos veces por semana y se calcularon a partir de las mediciones del calibre (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

20 La **Figura 23** muestra que el tratamiento de ratones con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE indujo la regresión tumoral de los tumores MDA-MB-231 en comparación con los grupos de control IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE. El tratamiento de los ratones con el ADC IgG1-b12-vcMMAE no dirigido no mostró actividad antitumoral en este modelo, lo que demuestra que la capacidad terapéutica de los AXL-ADC depende de la unión específica a la diana. El análisis estadístico del tamaño del tumor el día 32 (prueba Anova de Una Vía), mostró que el tamaño promedio del tumor en ratones que habían sido tratados con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE fue significativamente menor que en ratones que habían sido tratados con IgG1-b12 e IgG1-b12-vcMMAE ($P < 0,001$). No se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento con IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE, lo que ilustra que estos indujeron una actividad antitumoral igualmente eficaz.

30 **Ejemplo 20 - La citotoxicidad *in vitro* inducida por los productos conjugados de fármaco y anticuerpos específicos de AXL depende de la expresión de la diana**

35 La citotoxicidad *in vitro* de IgG1-AXL-107-vcMMAE se sometió a prueba en líneas celulares tumorales humanas con diferentes niveles de expresión de AXL.

Cultivo de células

40 Las células LS174T (línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano; ATCC, Núm. de cat. CL-188) se cultivaron en Medio Esencial Mínimo (MEM) con Glutamax, HEPES y Rojo Fenol (Life Technologies, Núm. de cat. 42360-024). Los componentes son Suero Donante Bovino con Hierro al 10% de (DBSI) (Life Technologies, Núm. de cat. 10371-029) y Piruvato de Sodio al 1% (100 mM; Lonza, Núm. de cat. BE13-115E) y 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza, Núm. de cat. DE17-603E).

45 Se cultivaron células NCI-H226 (carcinoma de células escamosas de pulmón humano; ATCC, Núm. de cat. CRL-5826), células NCI-H661 (cáncer de pulmón de células grandes humano; ATCC, Núm. de cat. HTB-183) y células NCI-H1299 (cáncer de pulmón de células no pequeñas humano; ATCC, Núm. de cat. CRL-5803) en medio RPMI 1640 (Modificación ATCC; Life Technologies, Núm. de cat. A10491-01). Los componentes son Suero Donante Bovino con Hierro al 10% (DBSI; Life Technologies, Núm. de cat. 10371-029) y 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza, Núm. de cat. DE17-603E).

50 Se cultivaron células SKOV-3 (adenocarcinoma de ovario humano; ATCC, Núm. de cat. HTB-77) en medio 5A de McCoy con L-glutamina y HEPES (Lonza, Núm. de cat. BE12-168F). Los componentes son Suero Donante Bovino con Hierro al 10% (DBSI; Life Technologies, Núm. de cat. 10371-029) y 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza, Núm. de cat. DE17-603E).

55 Se cultivaron células Calu-1 (carcinoma epidermoide de pulmón humano; ATCC, Núm. de cat. HTB-54) en medio 5A de McCoy con Catopeptona, sin HEPES (Life Technologies, Núm. de cat. 26600-023). Los componentes son Suero Donante Bovino con Hierro al 10% (DBSI; Life Technologies, Núm. de cat. 10371-029) y L-glutamina al 1% (200 nM) en solución de NaCl al 0,85% (Lonza, Núm. de cat. BE17-605F) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Lonza, Núm. de cat. DE17-603E). Las células Calu-1 son resistentes a la terapia dirigida a EGFR.

60 Se cultivaron células LCLC-103H (cáncer de pulmón de células grandes humano), células A431 (adenocarcinoma epidermoide humano) y células MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) como se describe en el Ejemplo 8.

Cuantificación de la expresión de AXL sobre la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas

La expresión de AXL sobre la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando QIFIKIT (DAKO, Núm. de cat. K0078) con anticuerpo monoclonal de ratón Z49M (Santa Cruz, Biotechnology, Núm. de cat. sc-73719). Las células adherentes se trataron con tripsina y se hicieron pasar a través de un filtro celular para obtener suspensiones de células individuales. Las células se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos a 1.200 rpm, se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/mL. Las siguientes etapas se realizaron sobre hielo. Se sembraron 100 μ L de las suspensiones de células individuales (100.000 células por pocillo) en placas de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Núm. de cat. 650101). Las células se sedimentaron por centrifugación durante 3 minutos a 300xg y se resuspendieron en 50 μ L de muestra de anticuerpo o muestra de control de isotipo de IgG1 de ratón (BD/Pharmingen, Núm. de cat. 555746) a una concentración de 10 μ g/mL. Después de una incubación de 30 minutos a 4°C, las células se sedimentaron y se volvieron a suspender en 150 μ L de tampón FACS. Las esferas de ajuste y calibración se añadieron a la placa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células y las esferas en paralelo se lavaron dos veces más con 150 μ L de tampón FACS y se resuspendieron en 50 μ L de anti-IgG de ratón de cabra conjugado con FITC (1/50; DAKO, Núm. de cat. K0078). El anticuerpo secundario se incubó durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células y las esferas se lavaron dos veces con 150 μ L de tampón FACS y se resuspendieron en 100 μ L de tampón FACS. La inmunofluorescencia se midió en un FACS Canto II (BD Biosciences) registrando 10.000 eventos dentro de la ventana de células viables. La intensidad de fluorescencia media de las esferas de calibración se utilizó para calcular la curva de calibración utilizando el soporte lógico GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Para cada línea celular, se calculó la capacidad de unión del anticuerpo (ABC), una estimación del número de moléculas AXL expresadas sobre la membrana plasmática, utilizando la intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con anticuerpo contra AXL, basándose en la ecuación de la curva de calibración (interpolación de incógnitas de la curva patrón, utilizando el Soporte Lógico GraphPad).

Ensayo de citotoxicidad

Para las células LCLC-103H, A431, MDA-MB-231, NCI-H226, NCI-H661, NCI-H1299, LS174T y SKOV-3, el ensayo de citotoxicidad *in vitro* se realizó como se describe en el Ejemplo 8. Para Calu-1, el ensayo de citotoxicidad se realizó como se describe en el Ejemplo 8, con la adaptación de que los cultivos celulares se incubaron durante 11 días en lugar de 5. Las curvas dosis-respuesta se generaron utilizando el soporte lógico Graphpad Prism, utilizando el análisis de regresión no lineal. El porcentaje de células viables a una concentración de IgG1-AXL-107-vcMMAE de 1 μ g/mL se interpoló a partir de las curvas de dosis-respuesta.

Como se muestra en **Figura 24**, IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo la citotoxicidad más potente en líneas celulares con una elevada expresión de AXL, mientras que la citotoxicidad fue baja o estuvo ausente en las líneas celulares con baja expresión de AXL. La figura también ilustra que IgG1-AXL-107-vcMMAE es eficaz en la inducción de citotoxicidad en células resistentes a la terapia dirigida a EGFR, tal como Calu-1.

Referencias

- [1] Pancez et al, Int. J. Cancer: 134, 1024-1033 (2013)
- [2] Leconet et al, Oncogene, 1-10 (2013)
- [3] Linger et al, Expert Opin. Ther. Targets, 14(10):1073-1090 (2010)
- [4] Li et al, Oncogene, 28, 3442-3455 (2009)
- [5] Ye et al, Oncogene, 1-11 (2010)
- [6] Alley et al, Current Opinion in Chem. Bio., 4, 529-537 (2010)
- [7] Iida et al, Anticancer Research, 34:1821-1828 (2014)
- [8] Documento WO 2012/175691; INSERM
- [9] Documento WO 2012/175692; INSERM
- [10] Documento WO 2013/064685; PF Medicament
- [11] Documento WO 2013/090776; INSERM
- [12] Documento WO 2009/063965; Chugain Pharmaceuticals
- [13] Documento WO 2010/131733
- [14] Hfizi et al., 2006, FEBS Journal, 273; 5231-5244

- [15] Documento WO 2007/059782; Genmab A/S
- [16] Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)
- [17] Holt et al; Trends Biotechnol. Nov 2003;21(11):484-90
- [18] Revets et al; Expert Opin Biol Ther. enero 2005;5(1):111-24
- 5 [19] Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)
- [20] Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)
- [21] Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)
- [22] Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999
- [23] Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)
- 10 [24] Korshunov et al, Clinical Science, 2012
- [25] Sambrook et al, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 15
- [26] Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5ª Edición - US Department of Health and Human Services, NIH publication Núm. 91-3242, pág. 662,680,689 (1991)
- 15 [27] Documento WO 2004/010957; Seattle Genetics, Inc.
- [28] Documento US 7.659.241; Seattle Genetics, Inc.
- [29] Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, En: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)
- [30] Documento WO 2011/131746; Genmab A/S
- 20 [31] Documento WO/2002/020039; Trion Pharma/Fresenius Biotech
- [32] Documento WO9850431; Genetech
- [33] Documento WO2011117329; Roche
- [34] Documento EP1870459; Amgen
- [35] Documento WO2009089004; Amgen
- 25 [36] Documento US201000155133; Chugai
- [37] Documento WO2010129304; Oncomed
- [38] Documento WO2007110205; EMD Serono
- [39] Documento WO 2010/015792; Regeneron
- [40] Documento WO11143545; Pfizer/Rinat
- 30 [41] Documento WO2012058768: Zymeworks/Merck
- [42] Documento WO2011028952; Xencor
- [43] Documento WO 2009/080254; Roche
- [44] Documento WO2008003116; F-Star
- [45] Documento US 7.262.028; Crucell/Merus
- 35 [46] Documento US 7.612.181; Abbott
- [47] Documento WO20100226923; Unilever, Sanofi Aventis
- [48] Documento US 7.951.918; Biogen Idec
- [49] Documento CN 102250246; Changzhou Adam Biotech Inc
- [50] Documento WO2012025525; Roche
- 40 [51] Documento WO2012025530; Roche
- [52] Documento WO2008157379; Macrogenics
- [53] Documento WO2010/080538; Macrogenics

- [54] Goodman et al., Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8ª Ed., Macmillan Publishing Co., 1990
- [55] Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993)
- [56] Documento US 5.194.594
- 5 [57] Documento US 2005/0238649
- [58] Documento WO 2013/173391; Concorthis Biosystems, Corp.
- [59] Junghans et al., en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996))
- [60] Documento US 4.681.581
- 10 [61] Documento US 4.735.210
- [62] Documento US 5.101.827
- [63] Documento US 5.102.990
- [64] Documento US 5.648.471
- [65] Documento US 5.697.902
- 15 [66] Documento US 4.766.106
- [67] Documento US 4.179.337
- [68] Documento US 4.495.285
- [69] Documento US 4.609.546
- [70] Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974)
- 20 [71] Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)
- [72] Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)
- [73] Antibody Engineering Handbook, editado by Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)
- [74] Documento WO 2002/083180; Syngenta BV
- [75] Documento WO 2004/043493; Syngenta BV
- 25 [76] Documento WO 2007/018431; Syngenta BV
- [77] Documento WO 2007/089149; Syngenta BV
- [78] Documento WO 2009/017394; Syngenta BV
- [79] Documento WO 2010/62171; Syngenta BV
- [80] Documento US 6.989.452; Medarex
- 30 [81] Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
- [82] Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- [83] Sykes y Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)
- 35 [84] Documento US 6.077. 835
- [85] Documento WO 00/70087
- [86] Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)
- [87] Documento WO 00/46147
- [88] Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)
- 40 [89] Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)
- [90] Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)
- [91] Documento US 5.589.466
- [92] Documento US 5.973.972

- [93] Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)
- [94] F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience Nueva York (1987)
- [95] Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)
- 5 [96] Lonberg, N. et al., Nature 368, 856 859 (1994)
- [97] Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 101 (1994)
- [98] Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65 93 (1995)
- [99] Harding, F. y Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536 546 (1995)
- [100] Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287 6295 (1992)
- 10 [101] Chen, J. et al., International Immunology 5, 647 656 (1993)
- [102] Tuaille et al., J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994)
- [103] Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579 591 (1994)
- [104] Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996)
- [105] Documento US 5.545.806
- 15 [106] Documento US 5.569.825
- [107] Documento US 5.625.126
- [108] Documento US 5.633.425
- [109] Documento US 5.789.650
- [110] Documento US 5.877.397
- 20 [111] Documento US 5.661.016
- [112] Documento US 5.814.318
- [113] Documento US 5.874.299
- [114] Documento US 5.770.429
- [115] Documento US 5.545.807
- 25 [116] Documento WO 98/024884
- [117] Documento WO 94/025585
- [118] Documento WO 93/001227
- [119] Documento WO 92/022645
- [120] Documento WO 92/003918
- 30 [121] Documento WO 01/009187.
- [122] Shieh, Neoplasia 2005
- [123] Koorstra, Cancer Biol Ther 2009
- [124] Hector, Cancer Biol Ther 2010
- [125] Sun, Ann Oncol 2003
- 35 [126] Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy (Plenum Press 1988), Chase
- [127] "Medical Applications of Radioisotopes," en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Gennaro et al., (eds.), pág. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990)
- [128] Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," en Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al.,
- 40 (eds.) (Chapman & Hall 1993)
- [129] Documento US 5.057.313
- [130] Documento US 6.331.175
- [131] Documento US 5.635.483

- [132] Documento US 5.780.588
- [133] Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584
- [134] Documento US5663149
- [135] Pettit et al., (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42:2961-2965
- 5 [136] Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research.* Volumen 45, resumen número 623, presentado el 28 de marzo de 2004
- [137] Documento US 2005/0238649
- [138] Documento US 7.498.298; Seattle Genetics, Inc.
- [139] Documento US 2009/0047296; Seattle Genetics, Inc.
- 10 [140] Documento WO 2005/081711; Seattle Genetics, Inc.
- [141] Kozak et al. (1999) *Gene* 234: 187-208
- [142] Documento EP 2 220 131; U3 Pharma
- [143] Documento WO 2011/159980; Genentech
- [144] Barbas, CF. *J Mol Biol.* 5 de abril de 1993;230(3):812-23
- 15 [145] Documento US 7.829.531; Seattle Genetics, Inc.
- [146] Documento US 7.851.437; Seattle Genetics, Inc.
- [147] Documento US 2008-0035001; Seattle Genetics, Inc.
- [148] Documento WO 2013/173392; Concoris Biosystems, Corp.
- [149] Documento WO 2013/173393; Concoris Biosystems, Corp.
- 20 [150] Sun et al. (2005) *Bioconjugate Chem.* 16: 1282-1290
- [151] McDonagh et al., (2006) *Protein Eng. Design Sel.* 19: 299-307
- [152] Alley et al., (2008) *Bioconjugate Chem.* 19: 759-765

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a AXL, en donde

- 5 - el anticuerpo no compite por la unión de AXL con el ligando 6 Específico de la Detención del Crecimiento (Gas6) y
 - el anticuerpo comprende al menos una región de unión, que comprende una región pesada variable (VH) y una
 región de cadena ligera variable (VL) seleccionada del grupo que consiste en;

- 10 a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38,
 respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:
 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**;
- b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 93, 94 y 95,
 respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:
 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;
- 15 c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 98, 99 y 100,
 respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:
 101, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**;
- d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 93, 94 y 95,
 respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:
 20 128, XAS, en donde X es D o G, y 129, respectivamente, **[613/613-08]**; y
- e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 93, 126 y 127,
 respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:
 96, GAS y 97, respectivamente **[613/608-01/610-01/620-06]**.

25 2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región de cadena pesada variable
 (VH) y una región de cadena ligera variable (VL) que tiene a lo sumo 10 mutaciones o sustituciones, a lo sumo 5
 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 4 mutaciones o sustituciones, a lo sumo 3 mutaciones o
 sustituciones, a lo sumo 2 mutaciones o sustituciones, a lo sumo 1 mutación o sustitución, a lo largo de dicha región
 VH y dicha región VL, seleccionándose la región VH y la región VL del grupo que consiste en;

- 30 a) una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 2 **[107]**;
- b) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;
- c) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 22 **[608-01]**;
- 35 d) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 24 **[610-01]**;
- e) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 28 **[613-08]**; y
- f) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 30 **[620-06]**.

3. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha al menos una región de
 unión comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en;

- 40 a) una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 2 **[107]**;
- b) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;
- c) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 22 **[608-01]**;
- 45 d) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 24 **[610-01]**;
- e) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 28 **[613-08]**; y
- f) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 30 **[620-06]**.

4. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la al menos una región de unión
 comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 36, 37 y 38,
 respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 39, GAS y
 40, respectivamente **[107]**.

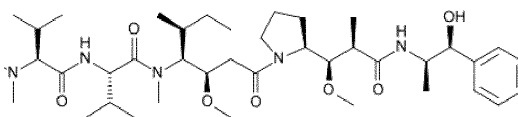
5. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una
 región de cadena pesada variable (VH) y una región de cadena ligera variable (VL) que tiene a lo sumo 10
 mutaciones o sustituciones, a lo sumo 5 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 4 mutaciones o
 sustituciones, tal como a lo sumo 3 mutaciones o sustituciones, tal como a lo sumo 2 mutaciones o sustituciones,
 tal como a lo sumo 1 mutación o sustitución, a lo largo de dicha región VH y dicha región VL, comprendiendo la región
 VH SEQ ID NO: 1 y comprendiendo la región VL SEQ ID NO: 2 **[107]**.

6. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la al menos una región de unión
 comprende una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 2 **[107]**.

7. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

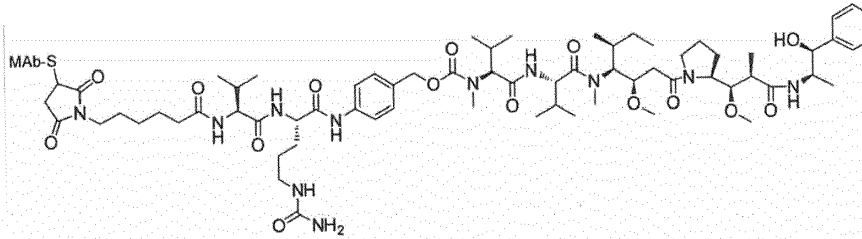
- i) la unión máxima del anticuerpo a AXL en presencia de Gas6 es al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 97%, tal como al menos 99%, tal como 100%, de la unión en ausencia de Gas6 como se determina por el método descrito en el Ejemplo 2;
- 5 ii) la unión máxima del anticuerpo a AXL en presencia de Gas6 es al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 97%, tal como al menos 99%, tal como 100%, de la unión en ausencia de Gas6 como se determina mediante un ensayo de competición, en donde la competición entre dicho anticuerpo que se une a AXL y dicho Gas6 se determina en células A431 preincubadas con Gas6 y sin Gas6;
- 10 iii) dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión (K_D) en el intervalo de $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M a AXL humana, y en donde dicha afinidad de unión se mide utilizando una interferometría de Bio-layer utilizando un dominio extracelular de AXL soluble; y/o
- iv) dicho anticuerpo tiene una velocidad de disociación de $9,7 \times 10^{-5}$ a $4,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ de AXL, y en donde la velocidad de disociación se mide por interferometría de Bio-layer utilizando el dominio extracelular de AXL recombinante soluble.
- 15 8. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde AXL es AXL humana como se especifica en SEQ ID NO: 130 y/o AXL de mono cinomolgo como se especifica en SEQ ID NO: 147.
9. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio de tipo Ig1 de AXL, dicho epítipo comprende o requiere uno o más aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de AXL humana.
- 20 10. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 25 11. El anticuerpo según la reivindicación 10, en donde el isotipo es IgG1, opcionalmente el alotipo IgG1m (f).
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo monoclonal completo, tal como un anticuerpo IgG1, κ monoclonal completo.
- 30 13. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo con una función efectora deficiente, un anticuerpo IgG4 estabilizado o un anticuerpo monovalente.
14. El anticuerpo según la reivindicación 13, en donde dicha cadena pesada se ha modificado de modo que se ha eliminado toda la región bisagra.
- 35 15. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.
16. Un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y una segunda región de unión que se une a una diana o epítipo diferente de dicha primera región de unión.
- 40 17. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 16, en donde dicho anticuerpo biespecífico comprende una primera y una segunda cadena pesada, cada una de dichas primera y segunda cadenas pesadas comprende al menos una región bisagra, una región CH2 y CH3, en donde en dicha primera cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 en una cadena pesada de IgG1 humana ha sido sustituido, y en dicha segunda cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana ha sido sustituido, y en donde dichas sustituciones de dicha primera y dicha segunda cadenas pesadas no están en las mismas posiciones.
- 45 18. El anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, en donde el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en dicha segunda cadena pesada, o viceversa.
- 50 19. Un producto inmunoconjugado que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, y un radical terapéutico, tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico, una citocina, un inmunosupresor, antibiótico, o un radioisótopo.
- 60 20. El producto inmunoconjugado según la reivindicación 19, en donde el radical terapéutico es un agente citotóxico.

21. El producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, en donde dicho agente citotóxico está unido a dicho anticuerpo con un conector escindible, tal como 4-(2-piridilditio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (SSP), maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (mc-vc-PAB) o AV-1 K-lock valina-citrulina.
22. El producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, en donde dicho agente citotóxico está unido a dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, con un conector no escindible, tal como 4(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (MCC) o maleimidocaproilo (MC).
23. El producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en donde dicho agente citotóxico se selecciona del grupo: agentes dirigidos al ADN, p. ej. alquilantes y entrecruzadores de ADN, tales como caliqueamicina, duocarmicina, raquelmicina (CC-1065), pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepinas (PBD) e indolinobenzodiazepina (IGN); agentes dirigidos a los microtúbulos, tales como duostatina, tal como duostatina-3, auristatina, tal como monometilauristatina E (MMAE) y monometilauristatina F (MMAF), dolastatina, maitansina, *n*(2')-desacetil-*n*(2')-(3-marcapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) y tubulisina; y análogos de nucleósidos; o análogos, derivados o profármacos de los mismos.
24. El producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en donde dicho producto inmunoconjugado comprende una combinación de;
- dicho agente citotóxico y dicho conector escindible que tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad;
 - dicho agente citotóxico y dicho conector escindible no tienen capacidad de destrucción por efecto de vecindad;
 - dicho agente citotóxico y dicho conector no escindible que tienen capacidad de destrucción por efecto de vecindad; o
 - dicho agente citotóxico y dicho conector no escindible no tienen capacidad de destrucción por efecto de vecindad.
25. El producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 y 23 a 24, en donde dicho conector es mc-vc-PAB y el agente citotóxico es MMAE; o el conector es SSP y el agente citotóxico es DM1.
26. El producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, en donde dicho producto inmunoconjugado comprende dicho conector mc-vc-PAB, dicho agente citotóxico es MMAE y dicho anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en;
- una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 2 **[107]**;
 - una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;
 - una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 22 **[608-01]**;
 - una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 24 **[610-01]**;
 - una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 28 **[613-08]**; y
 - una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 30 **[620-06]**.
27. El producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 219 y 21 a 22, en donde dicho conector es MMC y el agente citotóxico es DM1; o el conector es MC y el agente citotóxico es MMAF.
28. El producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 y 23 a 27, en donde el agente citotóxico es monometil auristatina E (MMAE);



MMAE se une al anticuerpo a través de un conector valina-citrulina (VC) en el nitrógeno (N) en el lado izquierdo de la estructura de MMAE.

29. El producto inmunoconjugado según la reivindicación 28, en donde MMAE está unida al anticuerpo a través de un conector, que es valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (mc-vc-PAB).
30. El producto inmunoconjugado según la reivindicación 29, en donde el agente citotóxico monometil auristatina E (MMAE) está unido al anticuerpo a través de un conector valina-citrulina (VC) y un conector maleimidocaproilo (MC), en donde la combinación del agente citotóxico y los conectores tiene la estructura química



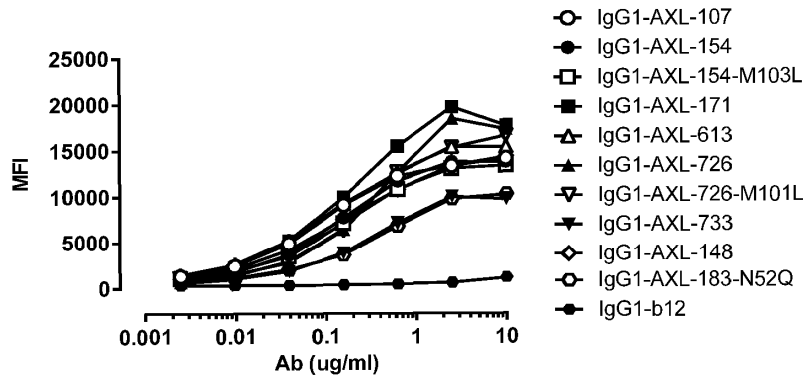
en donde MAb es el anticuerpo.

- 5 31. Una composición que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30.
- 10 32. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 33. Una construcción de ácido nucleico que codifica un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
34. Un vector de expresión que comprende una o más construcciones de ácido nucleico según la reivindicación 33.
35. Una célula anfitriona que comprende un vector según la reivindicación 34.
- 20 36. La célula anfitriona según la reivindicación 35, en donde dicha célula anfitriona es una célula anfitriona recombinante, tal como una célula anfitriona procariótica recombinante, eucariótica recombinante o microbiana recombinante.
- 25 37. La célula anfitriona según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 36, en donde la célula anfitriona produce un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.
- 30 38. Un hibridoma que produce un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
39. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, el anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o el producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30, para su uso como medicamento.
- 35 40. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, el anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o el producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30, para su uso en el tratamiento del cáncer.
41. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 39 a 40, en donde el cáncer es un tumor sólido que expresa AXL o un cáncer hematológico que expresa AXL.
- 40 42. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 41, en donde el cáncer hematológico se selecciona del grupo que consiste en leucemia, tal como leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide, leucemia mieloide aguda (AML) y leucemia mieloide crónica, linfoma tal como linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple.
- 45 43. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 41, en donde el tumor sólido que expresa AXL es cáncer de pulmón o carcinoma epidermoide.
44. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 41, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, tal como carcinoma colorrectal y adenocarcinoma colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de hueso tal como condrosarcoma, cáncer de mama tal como cáncer de mama triple negativo, cánceres del sistema nervioso central tales como glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de tejido conectivo, cáncer de endometrio, cáncer de fibroblastos, cáncer gástrico tal como carcinoma gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado tal como carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón como NSCLC y carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer de músculo, cáncer de tejido neural, cáncer de ovario, cáncer pancreático tal como carcinoma ductal pancreático y adenocarcinoma pancreático, cáncer de piel tal como melanoma maligno y sarcoma de tejidos blandos.
- 50
- 55

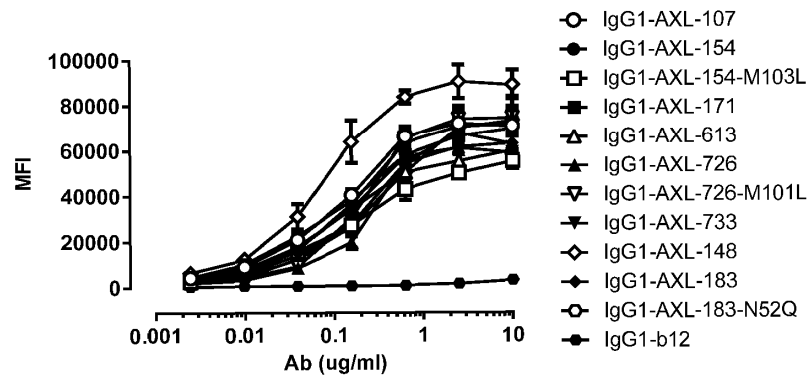
45. Un método para producir un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, comprendiendo dicho método las etapas de
- 5 a) cultivar una célula anfitriona según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 o un hibridoma según la reivindicación 38, y
b) purificar el anticuerpo de los medios de cultivo.
46. Una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.
- 10 47. Un método para detectar la presencia de anticuerpo contra AXL, o una célula que expresa AXL, en una muestra que comprende las etapas de;
- 15 a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 30, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo, el anticuerpo biespecífico o el producto inmunoconjugado y AXL; y
20 b) analizar si se ha formado un complejo.
48. Un kit para detectar la presencia del antígeno AXL, o una célula que expresa AXL, en una muestra que comprende
- 25 i) un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un producto inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30; y
ii) instrucciones de uso de dicho kit.
- 30 49. Un anticuerpo antiidiotípico que se une a un anticuerpo anti-AXL de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

Figura 1

A



B



C

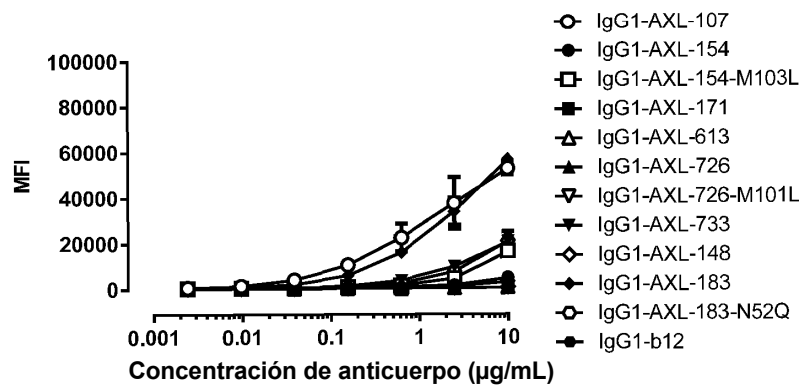


Figura 2

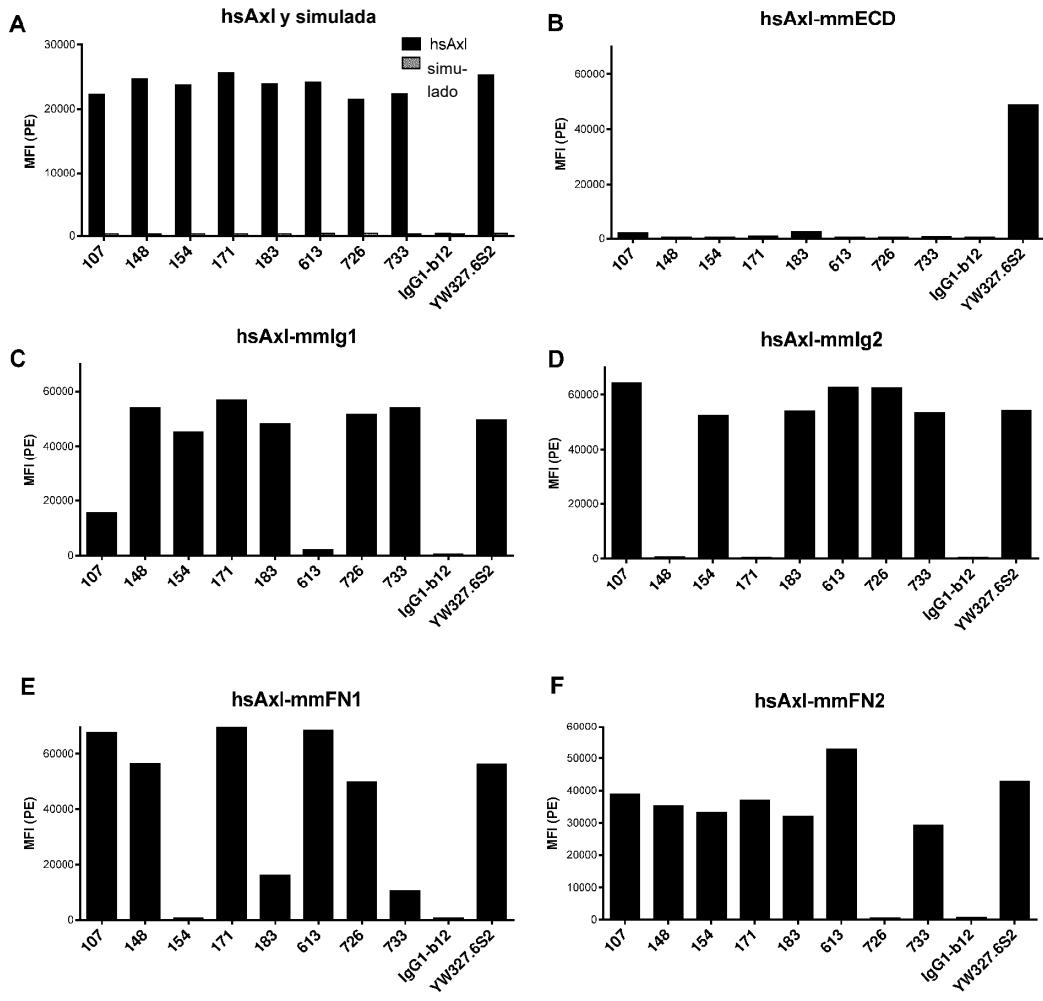


Figura 3

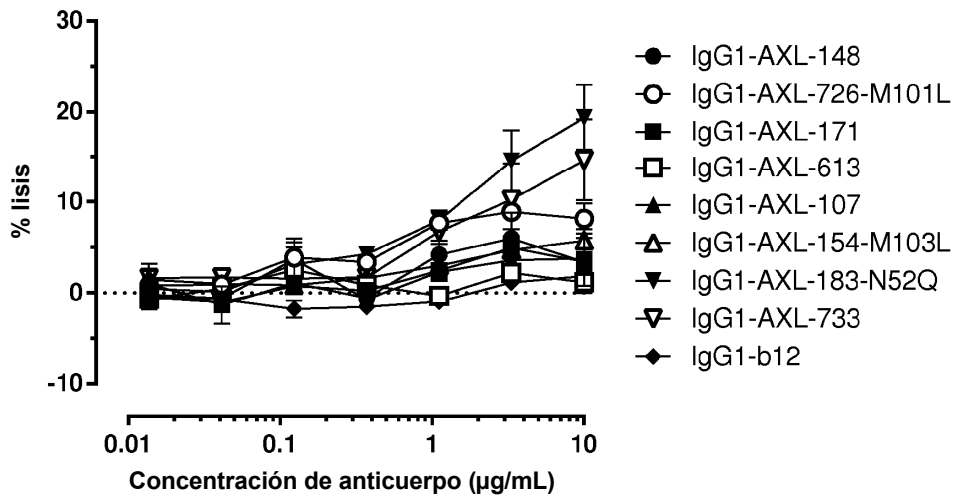


Figura 4

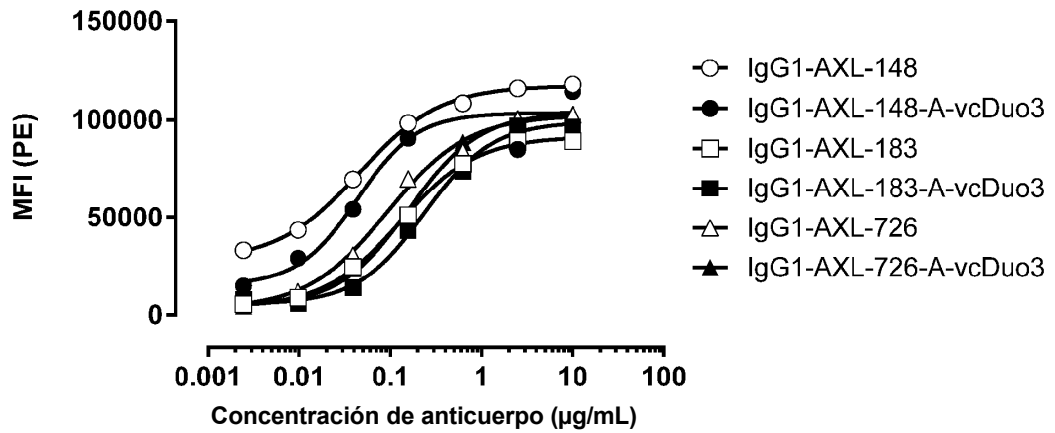
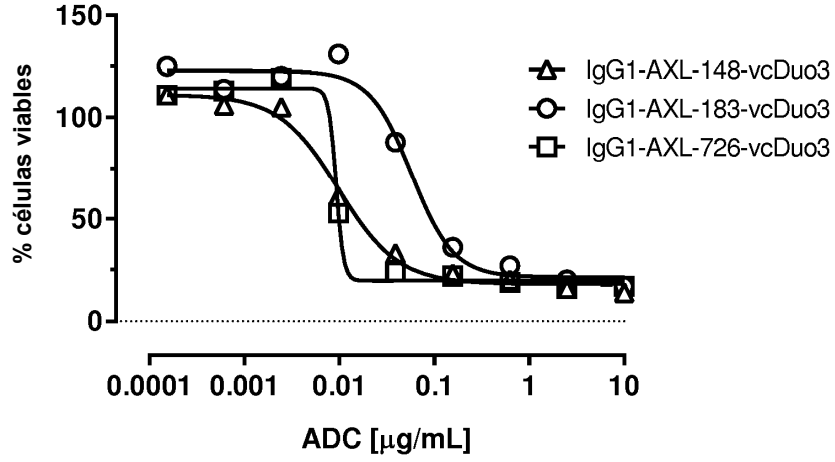


Figura 5

A



B

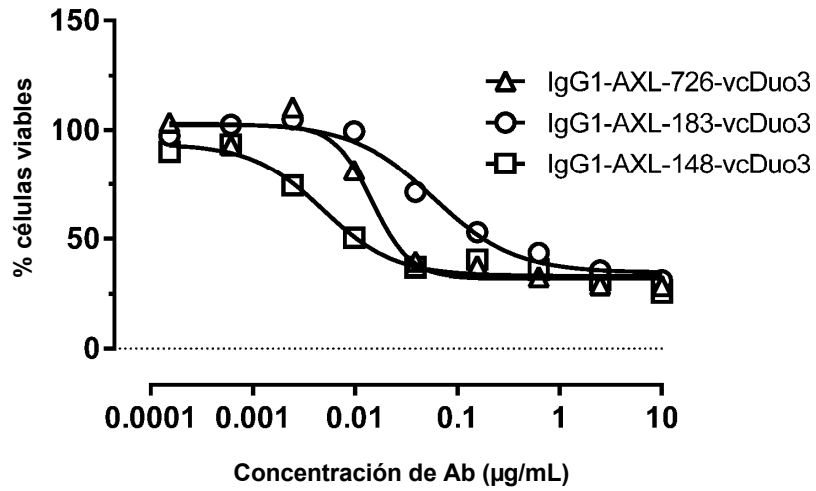


Figura 7

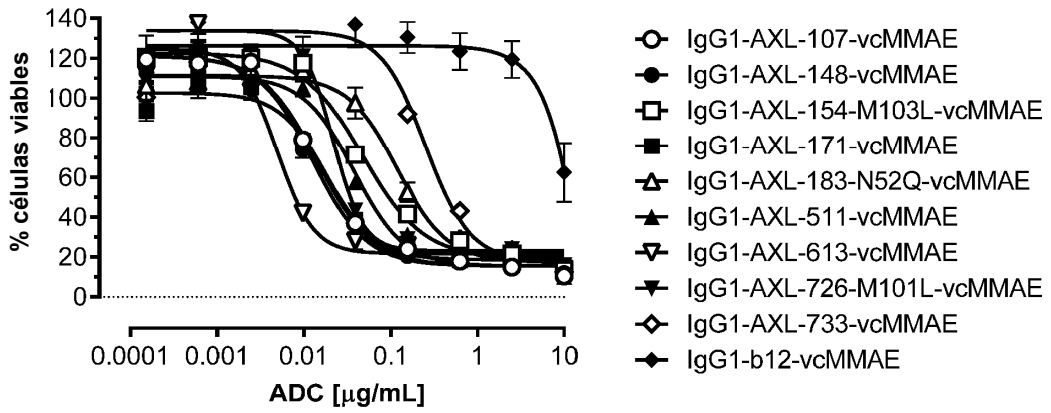


Figura 8

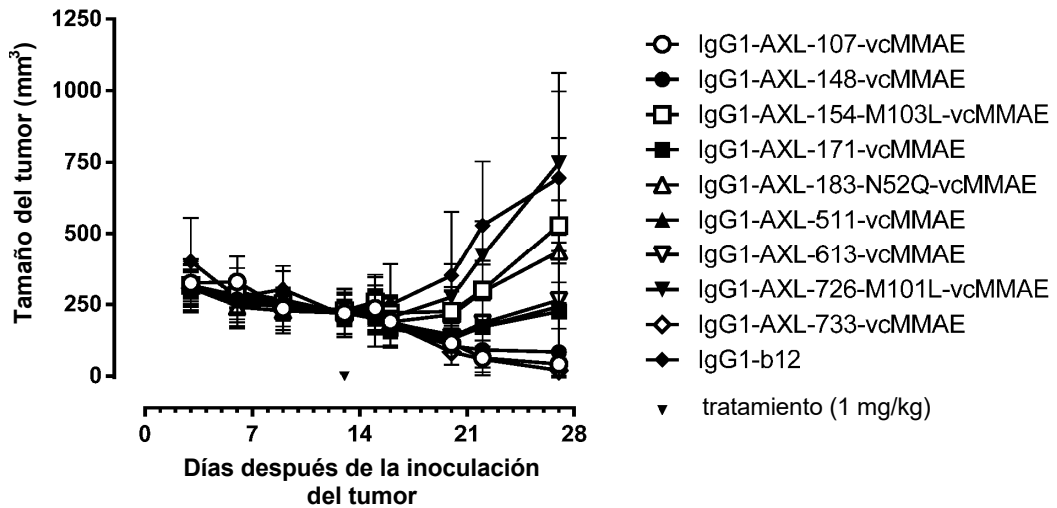


Figura 9

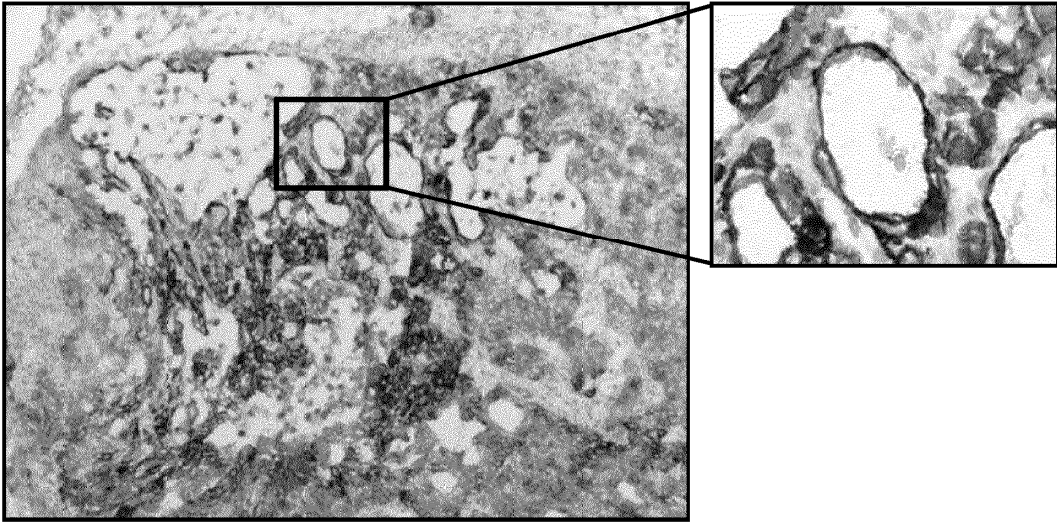
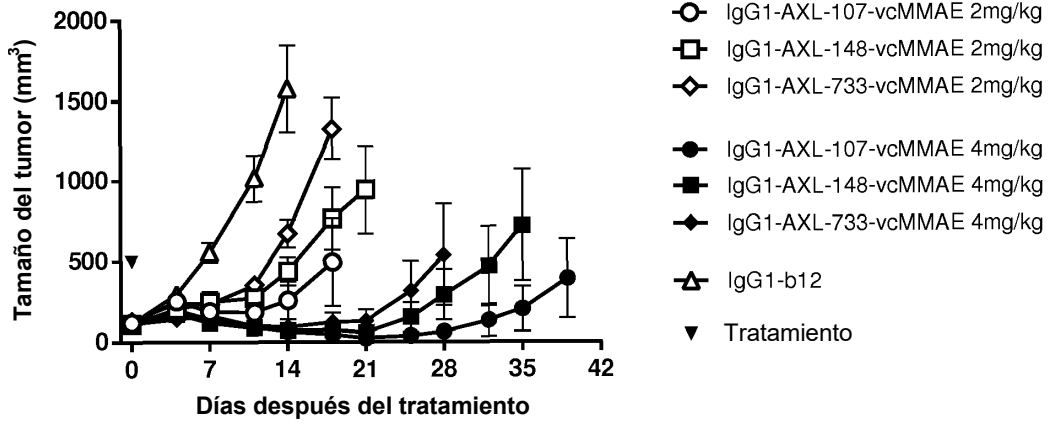


Figura 10

A



B

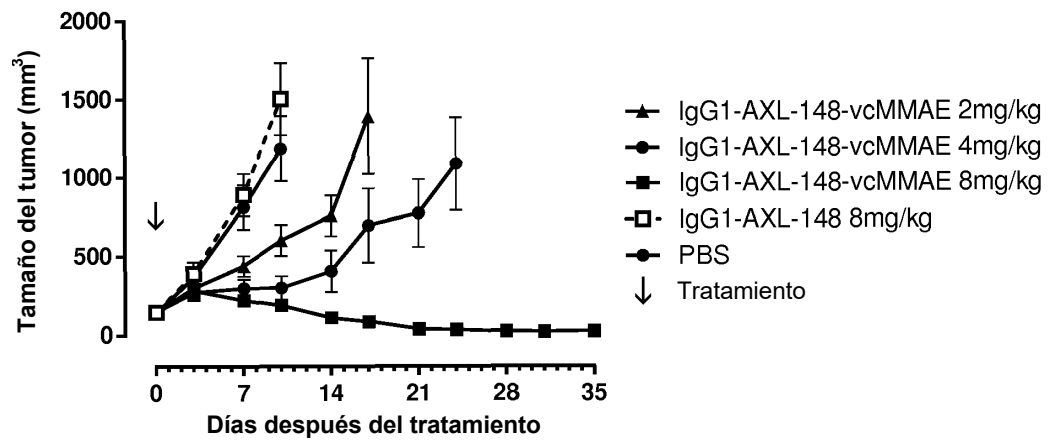


Figura 10

C

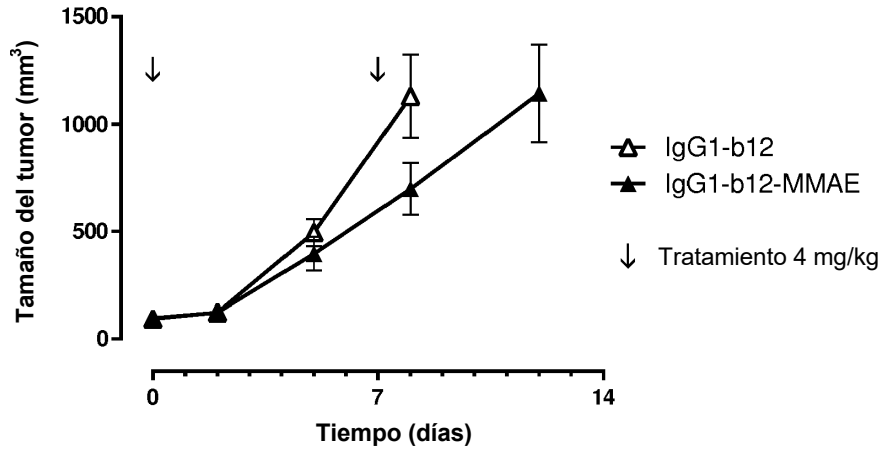


Figura 11

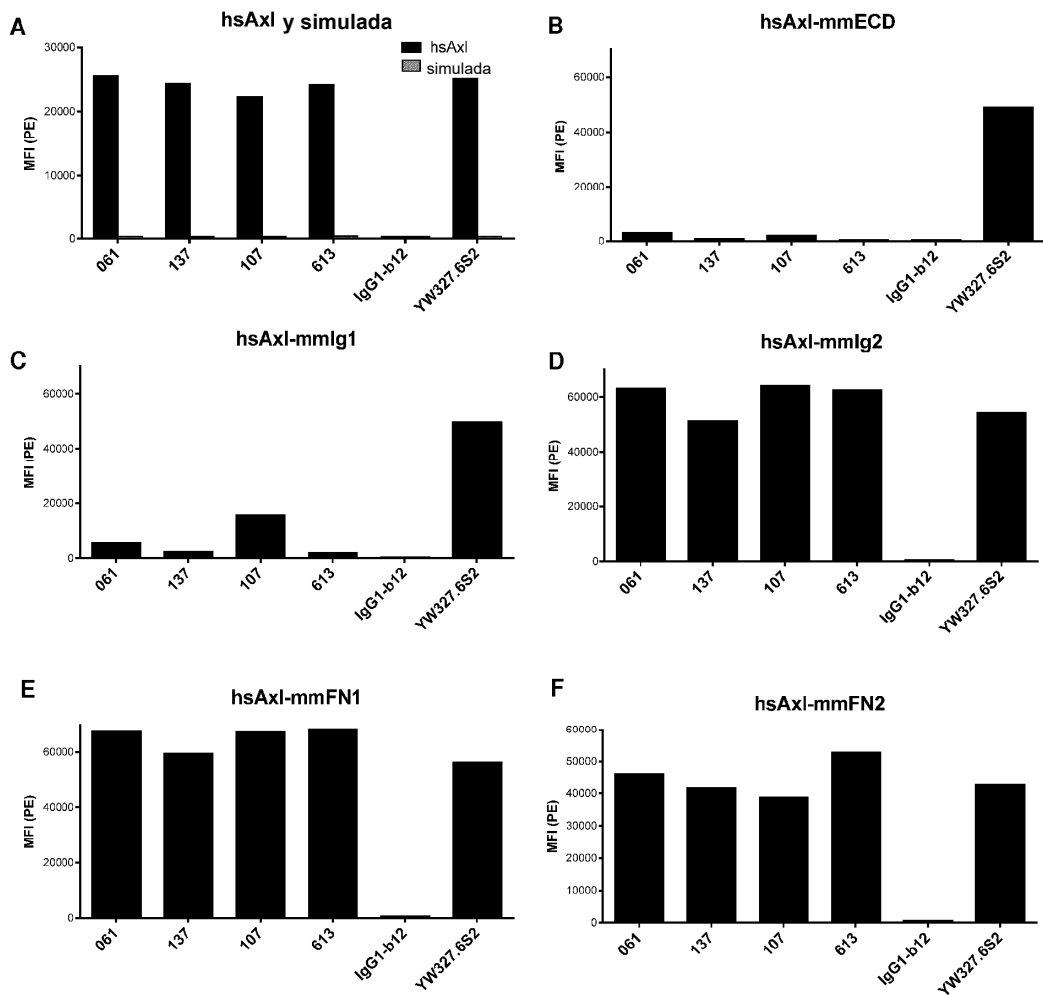


Figura 12

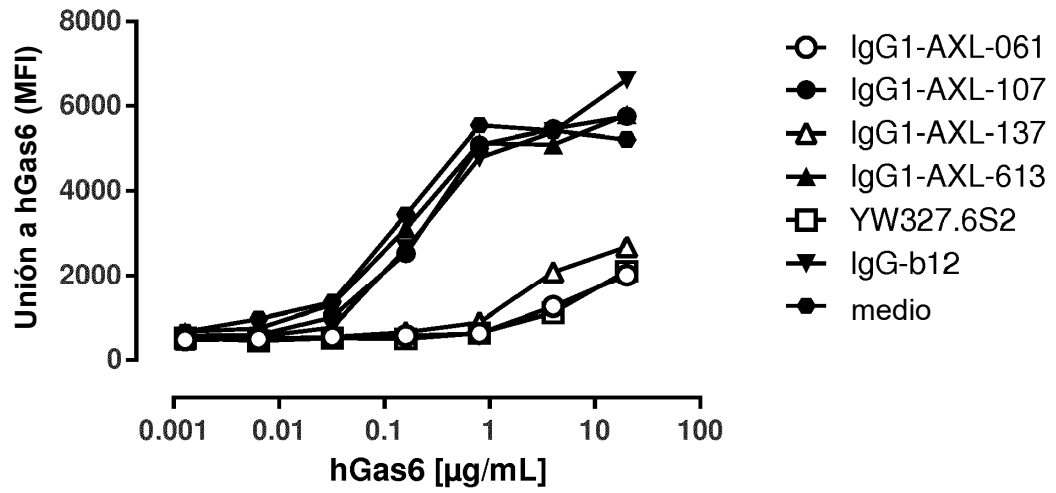
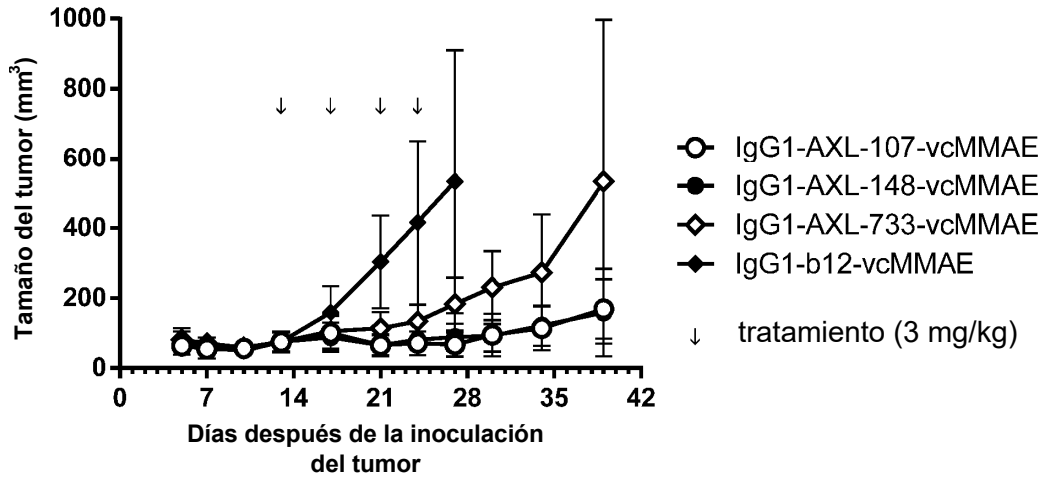


Figura 13

A



B

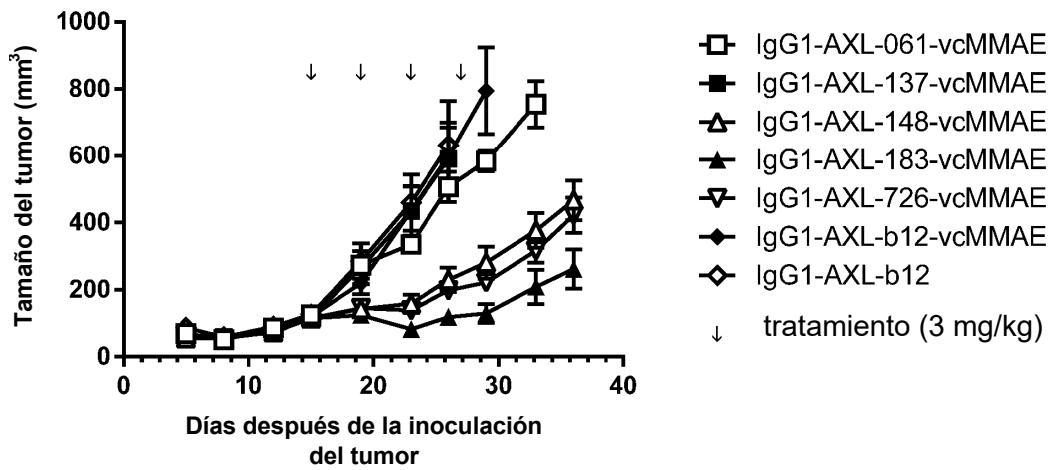
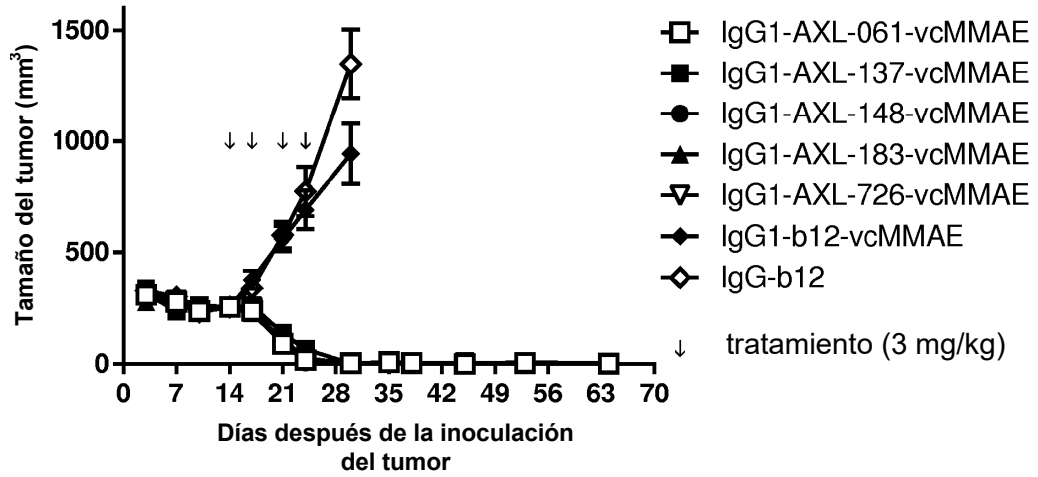


Figura 14

A



B

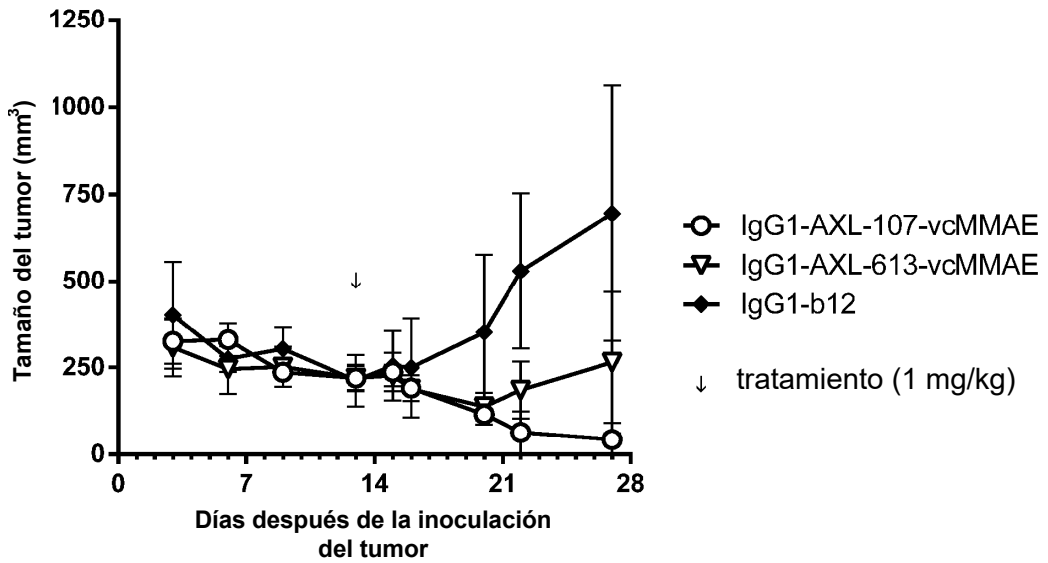
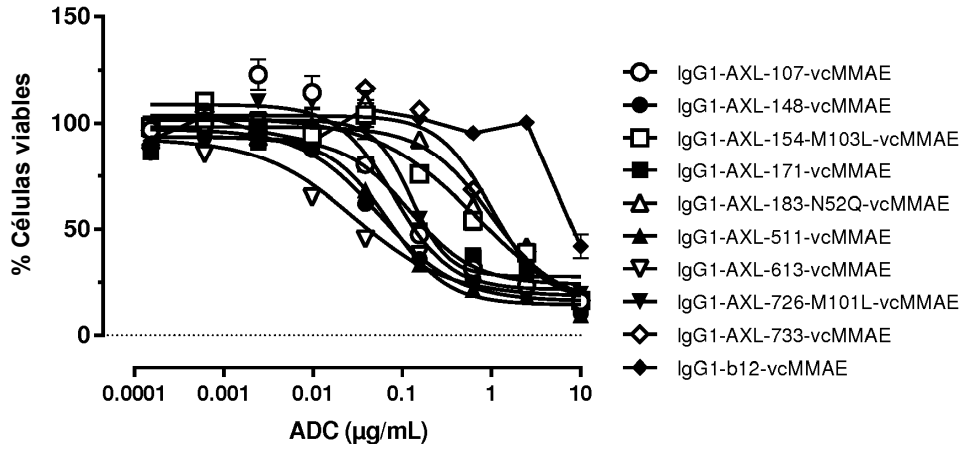


Figura 15

A



B

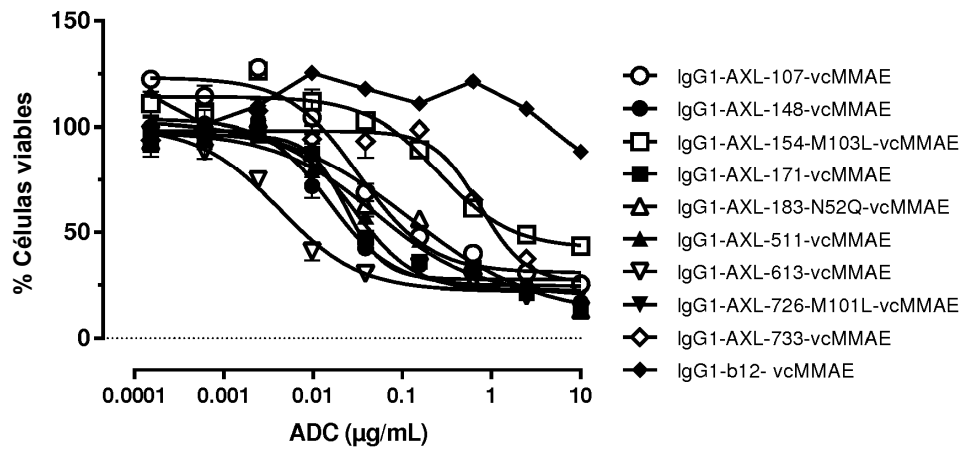


Figura 16

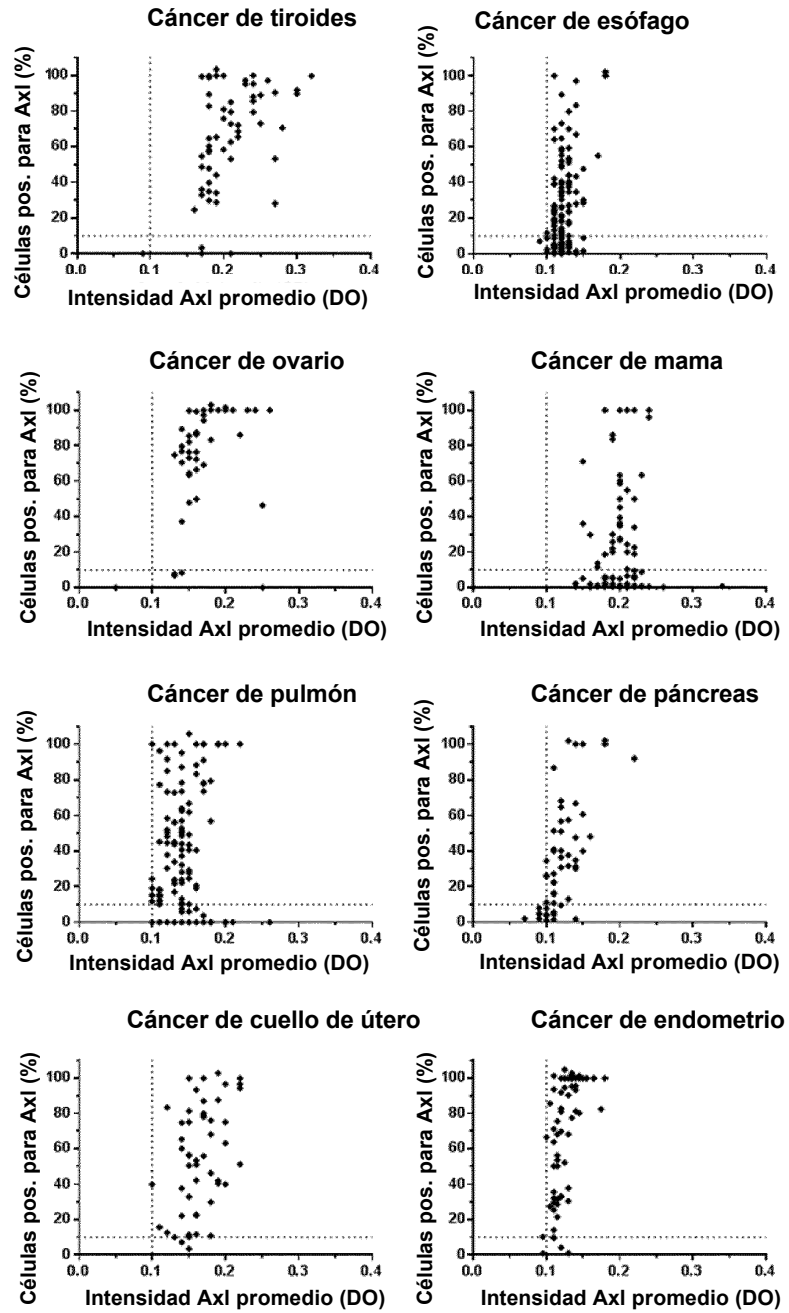


Figura 17

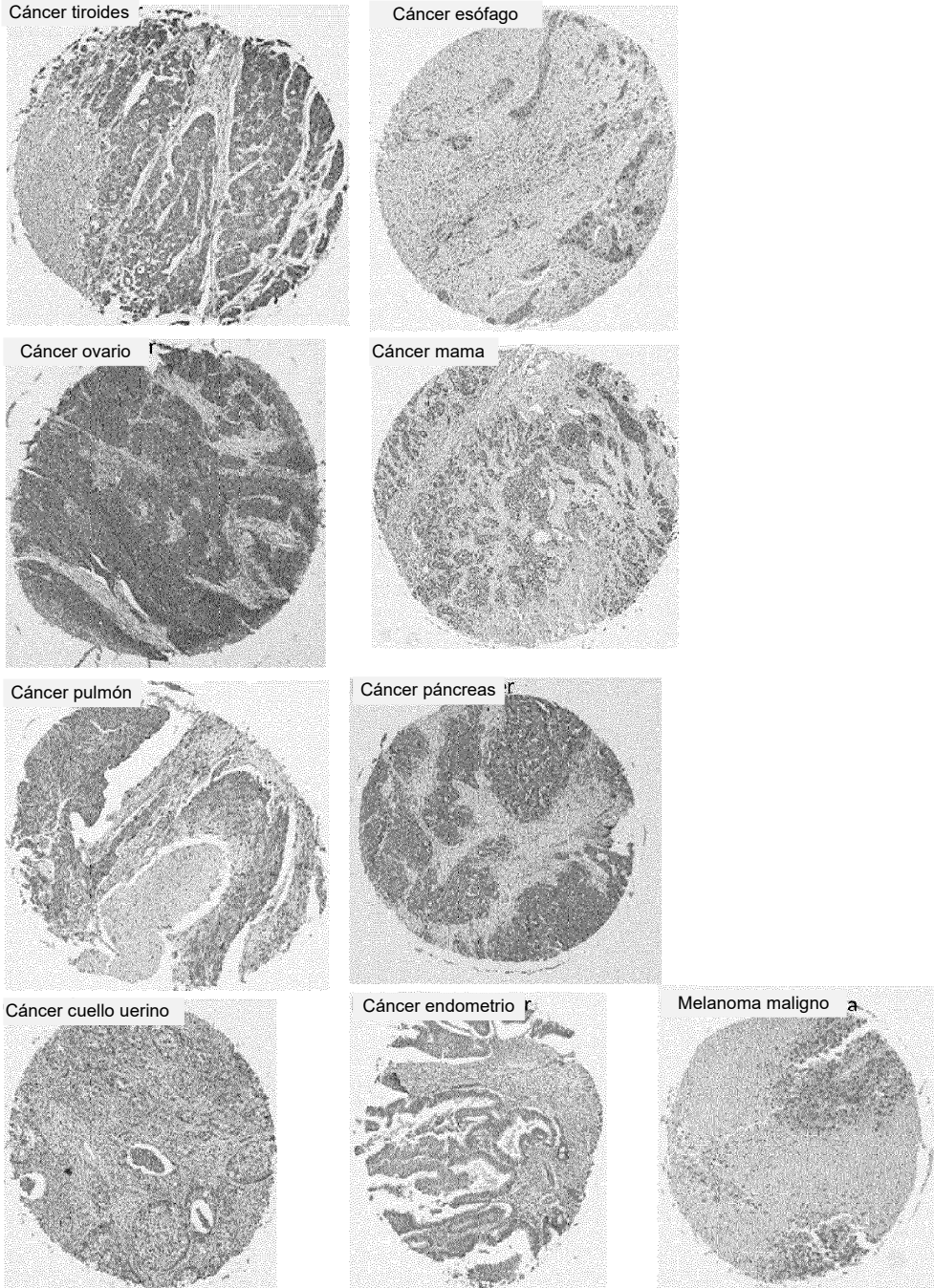


Figura 18

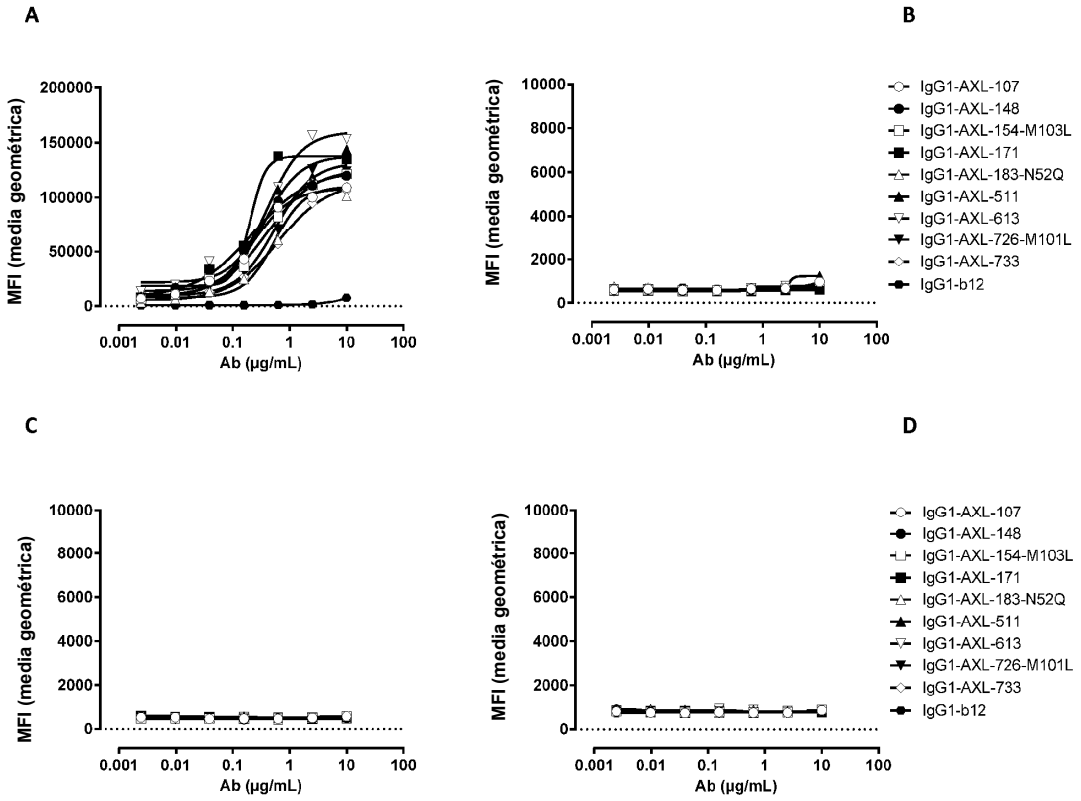
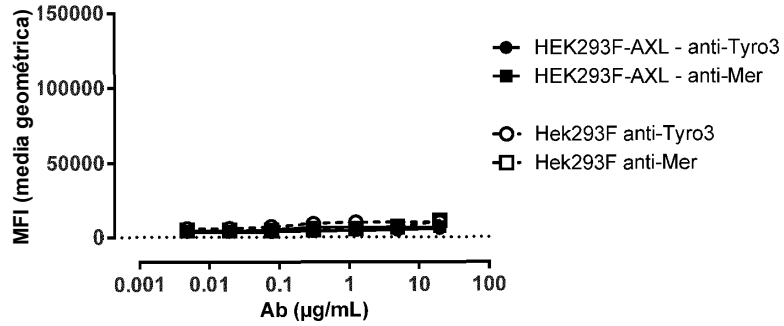
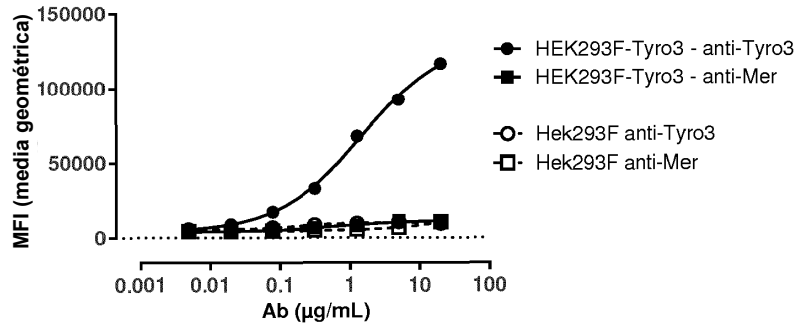


Figura 18 (continuación)

E



F



G

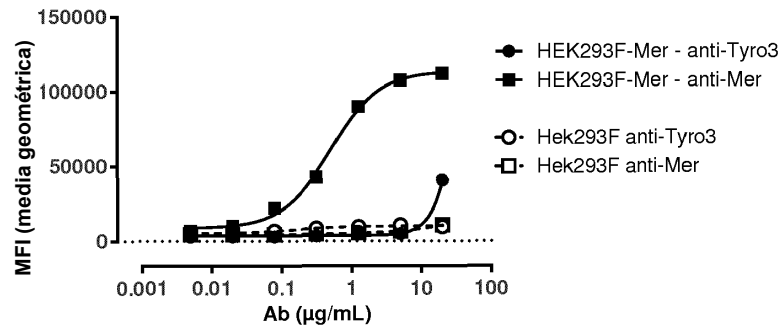


Figura 19

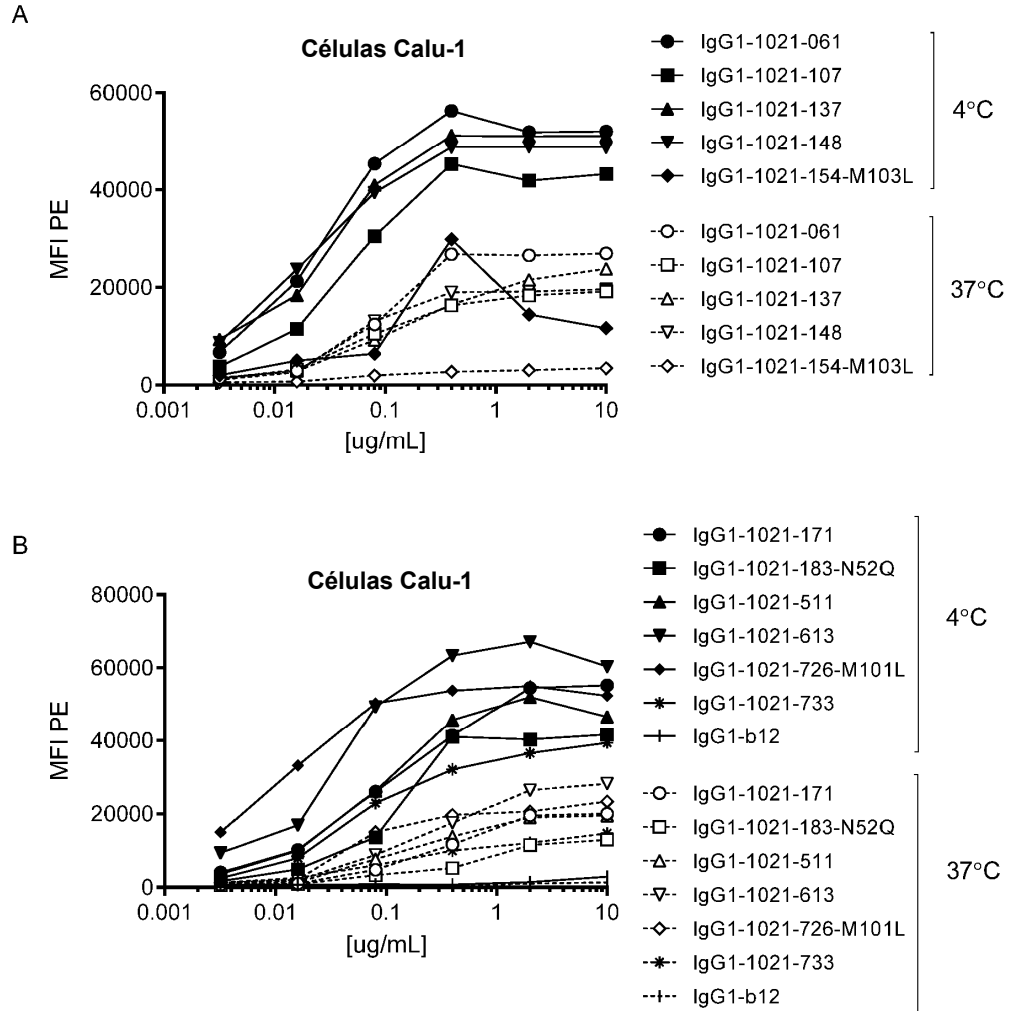


Figura 19 (continuación)

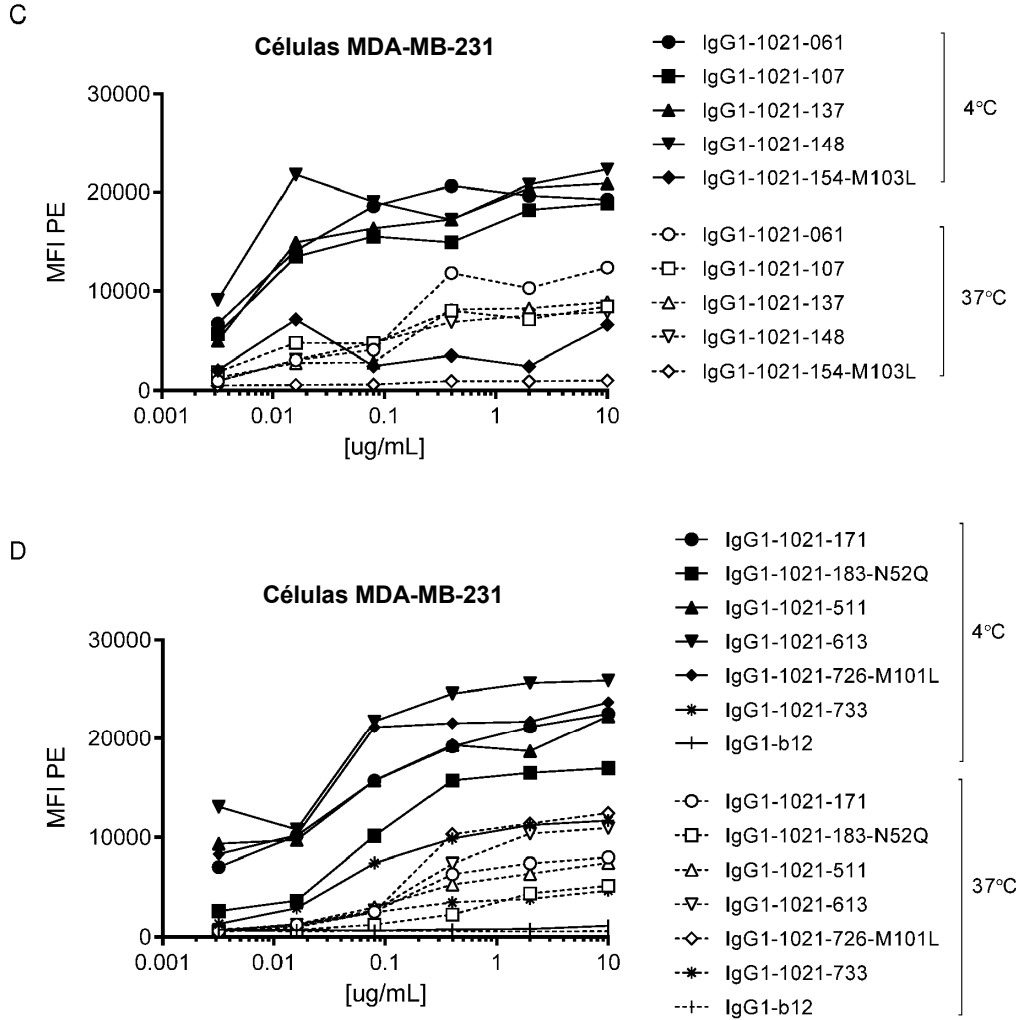


Figura 20

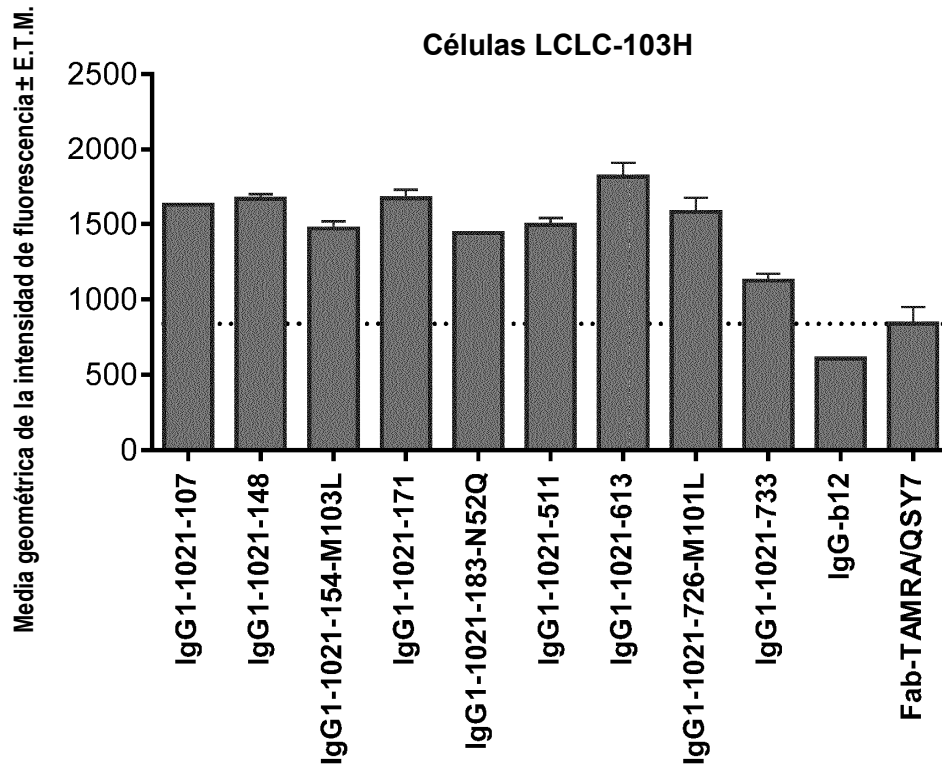
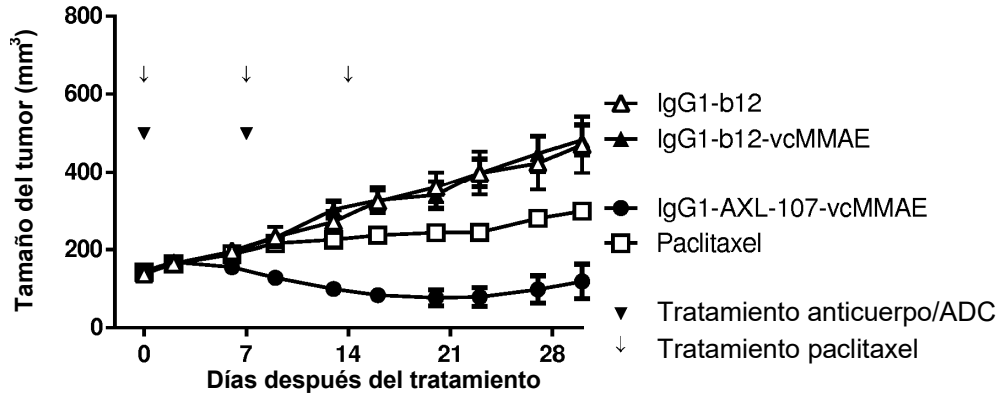


Figura 21

A



B

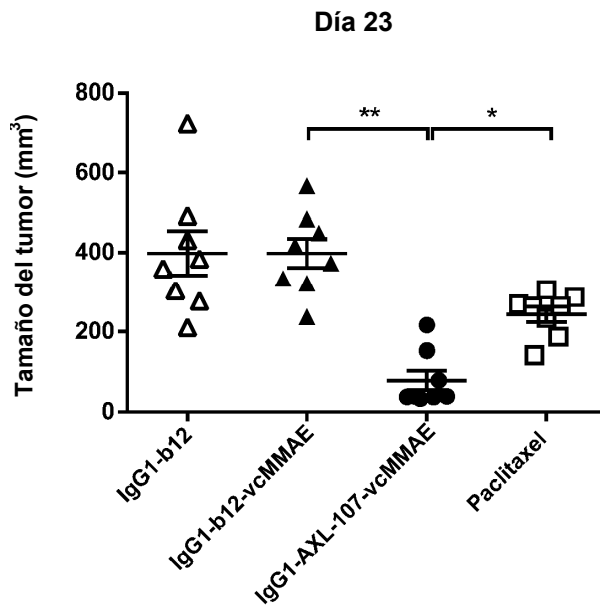
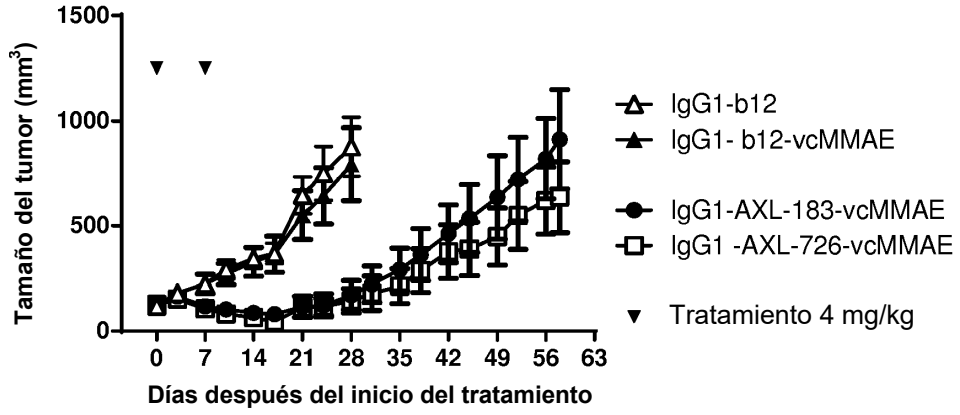


Figura 22

A



B

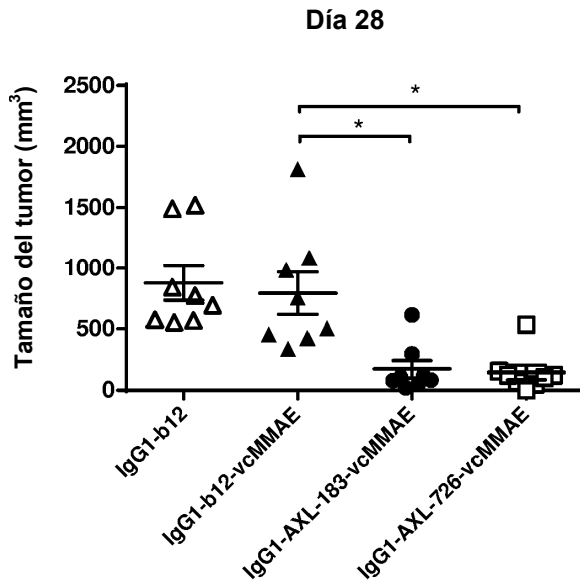
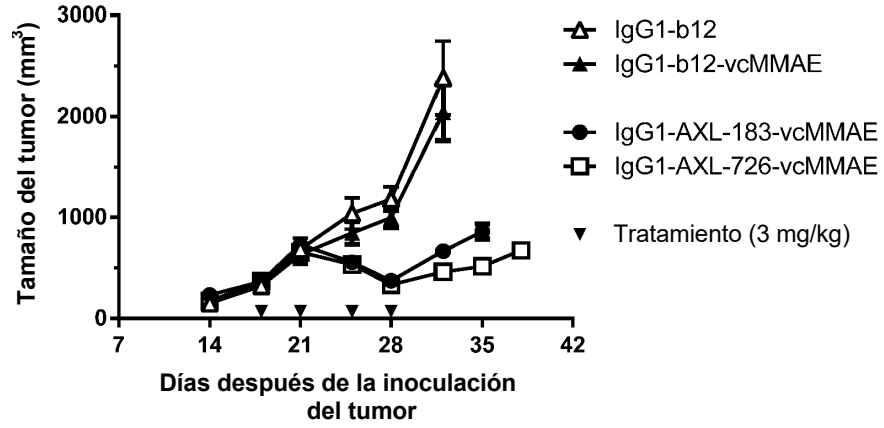


Figura 23

A



B

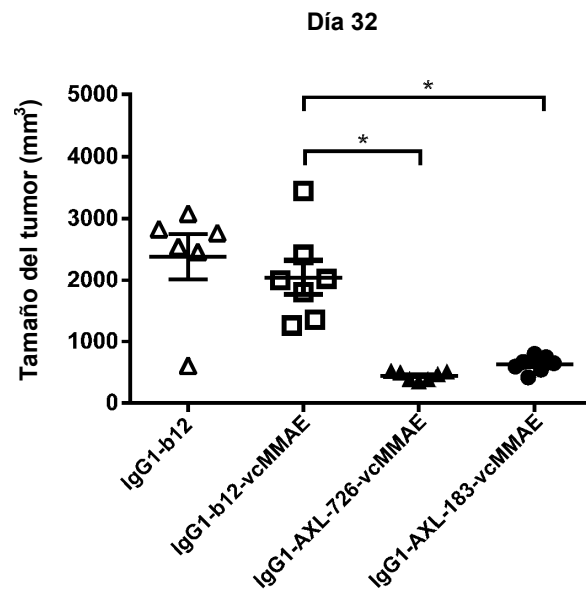


Figura 24

